

**Herstellung und Untersuchungen von mesenchymalen
Stromazellpräparaten unter GMP-nahen Bedingungen zum
Einsatz bei Patienten nach hämatopoetischer
Stammzelltransplantation**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Sabine Knoll

geboren am 14.11.1984

in Gera

Gutachter:

1. Prof. Dr. James Beck, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin,
Universitätsklinikum Jena
2. PD Dr. Inken Hilgendorf, Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Ingo Müller, Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für
Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.07.2015

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serum-Albumin
BrdU	Bromdesoxyuridin
CD	cluster of differentiation
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix (engl. extracellular matrix)
EDB	Extradomäne B
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. ethylene diamine tetraacetic acid)
EGF	epidermal growth factor
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Flouresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GlyA	Glycophorin A
GMP	good manufacturing practice
GvHD	Transplantat-gegen-Empfänger Erkrankung (engl. graft-versus-host disease)
GvLR	Transplantat-gegen-Leukämie Reaktion (engl. graft-versus-leucemia reaction)
GvTR	Transplantat-gegen-Tumor Reaktion (engl. graft-versus-tumor reaction)
h	Stunde
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
huS	Humanserum

IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves modified Dulbeccos medium
Kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
MAPC	multipotent adult progenitor cells
MIAMI	marrow isolated adult multilineage inducible cells
MASC	multipotent adult stem cells
MACS	magnetic-activated cell sorting
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
MLR	gemischte Lymphocytenreaktion (engl. mixed lymphocyte reaction)
MNC	mononuclear cells
MSC	Mesenchymale Stromazellen (engl. mesenchymal stroma cells)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMNC	peripheral blood mononuclear cells
PBSC	peripheral blood stem cells
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	plateled derived growth factor
PRB	Plazentarestblut
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium, benannt nach dem Ort der Entwicklung)
SBA	Sojabohnenagglutinin
SCF	stem cell factor
Sp	Spender
SSEA-4	stage-specific embryonic antigen-4
Stro-1	stromal precursor antigen-1
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
U/min	Umdrehungen pro Minute

UCB	Nabelschnurblut (engl. umbilical cord blood)
ZZ	Zellzahl

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Hämatopoetische Stammzelltransplantation	3
2.2	Das HLA-System und die alloreaktive Immunantwort.....	4
2.3	Komplikationen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation.....	7
2.4	Mesenchymale Stromazellen	8
2.4.1	Eigenschaften von MSC.....	10
2.4.2	MSC in der klinischen Anwendung.....	14
2.4.2.1	MSC und hämatopoetische Stammzelltransplantation	15
2.4.3	Quellen für mesenchymale Stromazellen.....	16
2.4.4	Verfahren zur Isolierung und Kultur von MSC	16
2.4.5	Zur Sicherheit der klinischen Anwendung	18
3	Ziele der Arbeit.....	19
4	Material und Methoden.....	20
4.1	Material.....	20
4.1.1	Medien, Puffer, Zusätze	20
4.1.2	Antikörper, Beads, Färbesubstanzen	22
4.1.3	Verbrauchsmaterial	24
4.1.4	Geräte	24
4.1.5	Software	25
4.1.6	Zellmaterial.....	25
4.2	Methoden	25
4.2.1	Aufbereitung der Seren	25
4.2.2	Aufbereitung der Zellpräparationen	25
4.2.3	Kryokonservierung	26
4.2.4	Auftauen und Stabilisieren von Zellmaterial	26
4.2.5	Separation von MSC aus Knochenmark	26
4.2.6	Separation von MSC aus Plazentarestblut.....	27
4.2.6.1	CD3-negativ-Depletion	27

4.2.6.2	CD3-negativ-Depletion/ Stro-1-positiv-Selektion	28
4.2.6.3	CD3-negativ-Depletion/ CD16-negativ-Depletion	28
4.2.6.4	CD3-negativ-Depletion/ CD16-negativ-Depletion und CD45-negativ/ GlyA-negativ- Depletion.....	28
4.2.6.5	Separation mittels Sojabohnenagglutinin	29
4.2.7	Kultivierung der PRB-Präparationen	29
4.2.8	Kultivierung der KM-Präparationen	30
4.2.9	Charakterisierung der Zellen aus KM und PRB.....	30
4.2.9.1	Anfertigung der Cytospins	30
4.2.9.2	Cytochemische Färbung (LSAB-Labeled Streptavidin-Biotin- Methode.....	30
4.2.10	Optimierungsversuche der Kulturbedingungen für MSC	31
4.2.10.1	Modifizierung der Kulturgefäße durch Beschichtung mit ECM- Komponenten	31
4.2.10.2	Variation des Kulturmediums, der Seren/Serumersatzmittel und Wachstumsfaktoren.....	32
4.2.11	Modifizierte gemischte Lymphozytenkultur zur Beurteilung der immunmodulatorischen Fähigkeiten von MSC	34
4.2.12	BrdU-Einbau-Assay.....	35
4.2.13	Durchflusszytometrische Analyse (FACS) der MLR.....	36
4.2.14	ELIBead-Assay zur Analyse der MLR.....	36
4.2.15	Statistik.....	37
5	Ergebnisse	38
5.1	Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen	38
5.1.1	Die Quantität von MSC in Knochenmarkaspiraten gesunder Spender.....	38
5.1.2	Die Variation der Kulturparameter	40
5.1.2.1	Kulturgefäßbeschichtung mit ECM-Komponenten.....	40
5.1.2.2	Variation des Kulturmediums.....	41
5.1.2.3	Variation von Seren.....	42
5.1.2.4	Variation der Wachstumsfaktoren	43
5.1.2.5	Zugabe von Serumsupplement	44
5.2	Separationsvarianten zur Anreicherung von MSC aus PRB.....	45

5.3	Der Vergleich der Qualität von MSC aus KM und PRB	46
5.4	Immunmodulatorische Eigenschaften der kultivierten MSC	50
5.4.1	Prüfung der Stimulatorzellen der MLR	52
5.4.2	Einfluss unterschiedlicher MSC-Konzentrationen auf die MLR	53
5.4.3	Immunmodulation durch MSC	54
5.4.4	Der Einfluss der MSC-Quelle auf die MLR	56
5.4.5	HLA-Reaktivität auf MSC in der MLR	58
6	Diskussion.....	62
6.1	Variation der Kulturbedingungen	63
6.1.1	ECM-beschichtete Kulturgefäße	63
6.1.2	Variation des Kulturmediums	65
6.1.3	Zusatz von Wachstumsfaktoren	67
6.2	Anreicherung von MSC aus Plazentarestblut	67
6.3	Test der Identität von MSC aus KM und PRB	72
6.4	Immunmodulation durch MSC	73
6.4.1	Prüfung des Modells	73
6.4.1.1	Test der Stimulatorzellen	73
6.4.1.2	Einfluss unterschiedlicher MSC-Konzentrationen auf die MLR	73
6.4.2	Die Modulation der Aktivierung von Effektorzellen durch MSC	74
6.4.3	Der Einfluss der MSC-Quelle auf die Immunmodulation durch MSC	76
6.4.4	HLA-Reaktivität auf MSC	78
7	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	83
8	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	86
9	Anhang	107
9.1	Abbildungsverzeichnis	107
9.2	Tabellenverzeichnis	109
9.3	Lebenslauf	110
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	111
9.5	Danksagung	112

1 Zusammenfassung

Die akute Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (engl. graft-versus-host-disease, GvHD) ist eine häufige Komplikation nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT), die mit einer deutlich erhöhten Mortalität verbunden ist. T-Zellen des Transplantates und eine massive inflammatorische Reaktion bewirken dabei eine Gewebeerstörung beim Empfänger v.a. in Gastrointestinaltrakt, Leber und Haut. Nicht bei allen Patienten lässt sich diese Reaktion durch die Standardtherapie mit Glukokortikoiden und Immunsuppressiva beherrschen. Ein vielversprechender Therapieansatz ist eine immunmodulierende zelluläre Therapie zum Beispiel mit mesenchymalen Stromazellen (engl. mesenchymal stroma cells, MSC). Man erhält MSC aus der mononukleären Zellfraktion des Knochenmarks oder auch aus Plazentarestblut (PRB), welches mit geringem Aufwand nach einer Geburt abgenommen und eingefroren werden kann. Man nimmt an, dass die kultivierten MSC nicht in Übereinstimmung der humanen Leukozytenantigene (HLA) gegeben werden müssen.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die den „Richtlinien der guten Herstellungspraxis“ (engl. good manufacturing practice, GMP) gerechten Bedingungen für die Kultur mesenchymaler Stromazellen zu finden, um zum erforderlichen Zeitpunkt genügend Zellen für einen klinischen Einsatz für pädiatrische Patienten nach HSZT zu erhalten. Zudem wurden verschiedene Separationsmethoden mit dem Ziel der Anreicherung von MSC aus Plazentarestblut getestet. Schließlich wurde mit Hilfe des Modells der gemischten Lymphozytenreaktion (engl. mixed lymphocyte reaction, MLR) untersucht, ob MSC unabhängig vom HLA-Typ verabreicht werden können.

Zur Optimierung der Kulturbedingungen kamen verschiedene Beschichtungen für die Kulturgefäße zur Verwendung sowie Variationen von Kulturmedien, Seren und Wachstumsfaktoren. Anhand der Stromakolonien (Spots) am Tag sieben und der daraus hervorgegangenen Zellzahlen am Tag 14 wurden die Variationen miteinander verglichen. Zur Anreicherung von MSC aus Plazentarestblut wurden mittels

Antikörpern gegen CD45, CD3, CD16, Glycophorin A und Stro-1 Negativ- und Positivdepletionen sowie eine Agglutinationsmethode angewandt. Zur Messung der Ergebnisse des erwähnten MLR-Modells wurden an den Tagen null, fünf und sieben mittels FACS-Analyse CD25-positive Zellen, Zellen mit dem Oberflächenmarkerprofil $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ und $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ ermittelt. Der Anteil IFN- γ -produzierender Zellen wurde mit dem ELIBEAD-Assay quantifiziert. Es wurde zudem untersucht, ob die Ergebnisse von der Dosis der zugegebenen MSC abhängig sind und ob sich MSC aus Knochenmark und PRB identisch verhalten.

Die optimalen GMP-nahen Kulturbedingungen ohne xenogene Bestandteile im Kulturmedium wurden mit der Verwendung von IMDM mit Einsatz von 10% inaktiviertem AB-Serum und 5% PRB-Serum und der Zugabe der Wachstumsfaktoren SCF, bFGF, EGF und PDGF ermittelt. Die Beschichtung der Kulturflächen mit Kollagen/Fibronectin bietet als beste Alternative der getesteten Bestandteile der extrazellulären Matrix einen den in vivo-Bedingungen angenäherten Adhäsionsgrund für MSC. Aus Knochenmark konnten innerhalb von drei bis vier Wochen genügend MSC für den Einsatz am pädiatrischen Patienten expandiert werden, aus Plazentarestblut mittels Negativdepletion der Zellen mit den Oberflächenmarkern CD3, CD16, CD45 und Glycophorin A jedoch nicht. Zudem unterschieden sich MSC aus Knochenmark und PRB in der Ausprägung der Oberflächenmarker CD73, Stro-1 sowie SSEA-4. Eine Unterdrückung der Immunreaktion von Responder- auf bestrahlte Stimulatorlymphozyten durch MSC in den durchgeführten MLR konnte nicht deutlich aufgezeigt werden, jedoch war in MLR mit Zugabe der MSC als Stimulatorzellen eine signifikante Aktivierung nachweisbar.

Deshalb sollten MSC zur Behandlung der akuten GvHD vom Stammzellspender gewonnen werden. Um eine zusätzliche Belastung des Spenders und einen Zeitverzug zu vermeiden, könnten dazu die bei der Transplantataufbereitung normalerweise verworfenen, ausgefilterten Knochenbröckchen aus den Filtersystemen unter GMP-Bedingungen gewonnen, kryokonserviert und bei Bedarf kultiviert und expandiert werden.

2 Einleitung

2.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist ein Verfahren, das eine kurative Behandlung für hauptsächlich maligne Erkrankungen des blutbildenden Systems darstellt. Dazu gehören u.a. die akuten und chronischen Leukämien, Non-Hodgkin-Syndrom, Myelodysplastisches Syndrom und das Multiple Myelom. Auch für solide Tumoren kann sie Teil des Therapieregimes sein. Aber auch im Falle nicht-maligner Erkrankungen bietet die HSZT eine Heilungschance. Indikationen sind Knochenmarkdysfunktionen wie Immundefekte und schwere Anämien, Autoimmun- und Stoffwechselerkrankungen.

Man unterscheidet die allogene Transplantation mit der Übertragung von Blutstammzellen eines Spenders an den Empfänger von der autologen Transplantation, bei der Spender und Empfänger dieselbe Person sind. Dabei spielt die autologe HSZT vor allem als sogenannte Stammzellen-Rescue eine Rolle. So kann nach hochdosierter Chemo- und/oder Strahlentherapie und der damit einhergehenden Myeloablation die Blutbildung aus eigenem Zellmaterial wieder aufgebaut werden. Eine seltene Sonderform stellt die syngene Transplantation zwischen eineiigen Zwillingen dar (Possinger 2007). Bei der allogenen HSZT wird nicht nur das hämatopoetische sondern auch die Immunsystem des Empfängers durch das des Spenders ersetzt. Dies erfordert, dass Spender und Empfänger in ihren Gewebemerkmale möglichst identisch sein müssen, um immunologische Komplikationen wie eine Abstoßung oder eine Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion zu vermeiden.

Als Quelle für die hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) diente lange Zeit ausschließlich das Knochenmark. Dabei werden in Vollnarkose dem Spender mittels Punktion der Spinae iliacae posteriores 1-1,5 l Knochenmarkaspirat entnommen. Heute werden zumeist nach einer Mobilisation mit Zytokinen wie granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) Stammzellen aus peripherem Blut (PBSC) mittels Apherese gewonnen. Eine dritte Quelle für HSZ stellt Plazentarestblut (PRB) dar,

welches nicht volle Übereinstimmung der humanen Leukozytenantigene (HLA) zwischen Spender und Empfänger benötigt, jedoch nur eine limitierte Zahl mononukleärer Zellen liefert (Kröger und Zander 2011).

2.2 Das HLA-System und die alloreaktive Immunantwort

Nach der Indikationsstellung für eine HSZT erfolgt als erstes die Spendersuche.

Für den Erfolg der Transplantation ist die Übereinstimmung der Gewebemerkmale zwischen Spender und Empfänger von entscheidender Bedeutung. Sie bestimmt Anwachsen oder Abstoßung des Transplantates und das Auftreten einer GvHD sowie die Transplantat-gegen-Tumor-Reaktion (GvTR).

Das gesunde Immunsystem ist in der Lage zwischen körpereigenen und körperfremd zu unterscheiden. Diese Fähigkeit ist essentiell zur Abwehr von pathogenen Keimen, ohne die eigenen Körperzellen anzugreifen, und wird beim Menschen über das HLA-System vermittelt. Es wird durch die Gene des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) auf Chromosom 6 codiert und stellt Moleküle zur Präsentation endo- und exogener Antigene an der Oberfläche der Zellen dar. Dabei werden HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, HLA-B, HLA-C) und -Klasse-II-Moleküle (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) unterschieden, welche stark polymorph sind. Klasse-I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen und binden an der Zelloberfläche endogene Peptide aus dem Cytosol der Zelle. Diese Peptide sind körpereigenen als auch viralen Ursprungs. Eine HLA-I-Peptid-Einheit bildet so den Liganden für Rezeptoren auf CD8-positiven T-Zellen. Klasse-II-Moleküle sind auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten zu finden. Die Klasse-II-Moleküle binden exogene Peptide aus intrazellulären Vesikeln und sind der Ligand für CD4-positive T-Zellen. Zur Aktivierung der naiven T-Lymphozyten kommt es nach Kontakt mit dem passenden Antigen (HLA-Peptid-Einheit) in Verbindung mit einem costimulatorischen Signal von der APZ. Außerdem erkennt das Immunsystem neben Krankheitserregern auch Alloantigene, also Antigene, die sich zwischen den Individuen einer Spezies unterscheiden, was bei der Transplantation fremder Gewebe zum Tragen kommt. Zu den Alloantigenen gehören die MHC-Moleküle

fremder Zellen aber auch weitere an anderen Genloci codierte Proteine, die Nebenhistokompatibilitätsantigene. Bei der alloreaktiven Immunantwort führt das fremde HLA-Molekül zusammen mit der costimulatorischen Aktivität auf der APZ eines Spenders zur direkten T-Zell-Aktivierung über den T-Zellrezeptor. Bei der indirekten Allogenerkennung lösen Allogene, welche auf den HLA-Molekülen der körpereigenen APZ gezeigt werden, die T-Zell-Aktivierung aus. Die semidirekte Allogenerkennung führt über die Präsentation von Spender-HLA-Peptid-Einheiten durch APZ des Empfängers zur Immunantwort (Afzali et al. 2008, Murphy et al. 2009).

Zu den costimulatorischen Signalen gehören die B7-Moleküle, die durch den Rezeptor CD28 auf dem T-Lymphozyt erkannt werden. Sieht der naive T-Lymphozyt Antigen und costimulatorisches Molekül, entwickelt er sich zum Lymphoblasten und es kommt zur klonalen Expansion. Ohne Costimulation wird der Lymphozyt inaktiviert. Erst wenn entscheidende Mengen an spezifischen Klonen erzeugt wurden, wandeln diese sich zu T-Effektorzellen um. Dabei bewirkt die Costimulation zum einen die Synthese und Ausschüttung von Interleukin-2 (IL-2), welches die Proliferation und Differenzierung sowie das Überleben der T-Zellen steuert, und zum anderen die Expressierung der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) mit höherer Affinität für IL-2 in den aktivierten T-Zellen. CD25 kann daher als früher Aktivierungsmarker gemessen werden. Wie bereits erwähnt, werden cytotoxische T-Zellen mit Corezeptor CD8 und Helfer-T-Zellen mit dem Corezeptor CD4 unterschieden. Trifft eine Effektorzelle auf ein HLA-Peptid-Antigen, wird sie aktiviert, ohne dass weitere costimulatorische Signale nötig sind. Eine aktivierte CD8-cytotoxische T-Zelle tötet die erkannte Zielzelle durch Auslösung der Apoptose mittels Zytotoxinen. Zudem schüttet sie die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) aus. Bei den CD4-positiven T-Zellen kennt man verschiedene Untergruppen, wie T_H1 - und T_H2 -, T_H17 - und regulatorische T-Zellen (Treg). Die verschiedenen Subtypen der CD4-T-Effektorzellen besitzen ein jeweils spezifisches Muster an Zytokinausschüttung. T_H1 -Zellen sezernieren beispielsweise IFN- γ , Lymphotoxin und TNF- α und führen so vor allem zur Makrophagenaktivierung. Durch T_H2 -Zellen abgegebene Zytokine IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 bewirken eine Aktivierung der B-Zellen, können mit IL-10 aber auch zur Blockierung der

Makrophagenaktivierung führen. T_H17-Zellen locken mit IL-17, IL-6, TNF und dem Chemokin CXCL1 Neutrophile an den Infektionsherd (Murphy et al. 2009). Eine Subpopulation der regulatorischen T-Zellen sind die natürlichen regulatorischen T-Zellen, welche CD4- und CD25-positiv charakterisiert sind. Diese Zellen sind in der Lage, autoreaktive T-Zellen zu inhibieren und daher ein wichtiges Instrument der peripheren Toleranz und können eine besondere Rolle bei der Abwendung einer GvHD-Reaktion spielen (Jonuleit und Schmitt 2003, Burr et al. 2012).

Der starke HLA-Polymorphismus stellt die Spendersuche vor einer HSZT vor eine große Herausforderung. Zur Bestimmung des HLA-Typs werden serologische und molekularbiologische Methoden verwendet. Als Stammzellspender sind dabei HLA-identische Geschwisterspender am besten geeignet. Steht keines zu Verfügung, müssen alternative Spender, wie HLA-identische Fremdspender, HLA-identische oder -teilidentische Familienspender oder Eltern/Kinder für eine haploidentische Spende gesucht bzw. ausgewählt werden. Zudem ist auch die Gabe von allogenen Plazentarestblut (PRB) möglich. In Deutschland wird für eine Stammzellspende durch nicht verwandte Fremdspender die Testung der HLA-A-, -B- und -C-, sowie HLA-DRB1- und HLA-DQB1- Allele gefordert und im günstigsten Fall resultiert eine Übereinstimmung in 10 von 10 vierstellig aufgelösten Allelen (ein sogenanntes 10/10-Match) (Kröger und Zander 2011).

Die gemischte Lymphozytenreaktion (engl. mixed lymphocyte reaction, MLR) ist ein in vitro-Modell für den Nachweis einer Alloreaktivität zwischen Spender und Empfänger (Bach und Hirschhorn 1964). Dazu werden periphere mononukleäre Zellen (MNC) zweier Individuen gemischt und die Aktivierung anhand der Zellproliferation mittels ³H-Thymidin- oder BrdU-Einbau gemessen. Um unterscheiden zu können, welche der Zellpopulationen reagiert („responder“ vs. „stimulator“), wird vor Ansetzen der Kultur jeweils eine der beiden Zellproben bestrahlt und kann somit nicht mehr proliferieren, wobei aber die Oberflächenstrukturen erhalten bleiben. Weitere messbare Parameter in einer MLR sind Aktivierungsmarker an der Oberfläche der Lymphozyten wie CD25 und CD69 sowie die sezernierten Zytokine IFN- γ oder TNF- α (Danzer et al. 1994). Nicht immer kann jedoch die Standard-MLR Alloreaktivitäten aufdecken und damit eine Vorhersage bezüglich des Auftretens von

Transplantatabstoßung oder GvHD treffen (Lim et al. 1988). Um die Vorhersagekraft zu verstärken und auch schwache Reaktionen sichtbar zu machen, kann die MLR modifiziert werden (Bishara et al. 1999). Eine Möglichkeit der Modifizierung und Sensitivierung der MLR ist die Zugabe von IL-2 und stem cell factor (SCF).

2.3 Komplikationen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation

Entsprechend der Transplantationsphasen Konditionierung – Stammzellgabe – Anwachsen des Transplantates (Engraftment) treten Komplikationen im Zusammenhang mit der HSZT auf. Durch die Konditionierung kommt es zur Aplasie und zu toxischen Nebenwirkungen an den Organen. In der zytopenischen Phase, die etwa zwei bis vier Wochen dauern kann, müssen prophylaktische Maßnahmen zur Verhinderung einer Infektion getroffen werden, wie z.B. die Pflege des Patienten in Laminar-Air-Flow-Einheiten sowie die Gabe von Breitbandantibiotika, antiviralen Substanzen und Antimykotika. Zur Unterdrückung von immunologischen Reaktionen des Empfängers, die zu Abstoßungsreaktionen führen würden und zur Vermeidung einer GvHD werden über einen längeren Zeitraum immunsuppressive Medikamente verabreicht. Dieses Therapieregime muss gut ausbalanciert werden, um den positiven Effekt dieser immunologischen Reaktionen, bei der die immunkompetenten Spenderlymphozyten verbliebene Tumorzellen im Körper des Patienten eliminieren können, zu erhalten (Possinger 2007, Kröger und Zander 2011). Die vollständige Immunrekonstitution kann mehrere Jahre dauern (Possinger 2007, Schmoll et al. 2006). Kommt es innerhalb von 28 Tagen nach HSZT nicht zu einem Anstieg der Neutrophilenzahl über 500/µl spricht man von einem primären Transplantatversagen. Beim sekundären Transplantatversagen kommt es pathophysiologisch zu einer Abstoßung des Transplantates durch immunkompetente Zellen des Empfängers, das Knochenmark rekonstituiert sich autolo-

g (Kröger und Zander 2011, Olsson et al. 2012). Eine Ursache des primären Transplantatversagens könnte das durch die Konditionierung vorgeschädigte Knochenmarkstroma sein. Ob im Transplantat enthaltene mesenchymale Stromazellen (MSC) bzw. zusätzliche Coinfusion von MSC des Spenders das Stroma wieder aufbauen und so das Anwachsen der HSZ unterstützen, ist bisher

nicht eindeutig nachgewiesen (Koç et al. 1999, Rieger et al. 2005, Bernardo et al. 2011).

Die akute GvHD ist eine gefürchtete Komplikation nach allogener HSZT. Abhängig von Risikofaktoren und Prophylaxemaßnahmen entwickeln 10-80% aller Patienten nach nicht T-Zell-depletierter allogener HSZT eine akute GvHD (Deeg 2007).

Pathophysiologisch reagieren die T-Zellen des Spenders gegen Zellen des Empfängers, was gemeinsam mit einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion zur Gewebszerstörung führt. Dabei unterscheidet man nach Ferrara drei aufeinander folgende Phasen. In der Konditionierungsphase vor HSZT kommt es im Empfänger vor allem durch die Ganzkörperbestrahlung zu Gewebsalteration, was eine vermehrte Zytokinausschüttung und daraus resultierend Hochregulation von Adhäsionsmolekülen sowie HLA-Molekülen zur Folge hat. Nach Transplantation folgt die Phase der Spender-T-Zell-Aktivierung. Die genaueren zellulären Abläufe wurden bereits im Kapitel 2.2. beschrieben. In der dritten Phase der Inflammation kommt es durch aktivierte Makrophagen zur massiven Ausschüttung inflammatorischer Zytokine, was synergistisch mit Effektorzellen (NK-Zellen, CTL) zur Gewebszerstörung führt (Ferrara et al. 1999).

Klinisch betroffen davon sind die Haut mit makulopapulösem Exanthem bis hin zu Blasenbildung und Ulzerationen, der Gastrointestinaltrakt mit schmerzhaften Diarrhoen sowie die Leber mit cholestatischem Ikterus. Entsprechend der klinischen Ausprägung erfolgt die Einteilung der akuten GvHD in die Schweregrade I (mild) bis IV (schwer, lebensbedrohlich) (Goker et al. 2001). Gold-Standard der Therapie besteht in der systemischen Gabe von Steroiden (Ferrara et al. 2009). Schlägt diese Therapie nicht an, wird die Behandlung unter anderem mit weiteren Immunsuppressiva eskaliert, was ein stark erhöhtes Infektionsrisiko birgt und in Folge zu hohen Mortalitätsraten führt (Deeg 2007).

2.4 Mesenchymale Stromazellen

Knochenmark enthält zwei Stammzelltypen- mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen. Die Bezeichnung mesenchymal meint deren Herkunft aus dem

Mesenchym, bezieht sich jedoch nicht auf deren Differenzierungspotential (Horwitz et al. 2005).

Die biologische Funktion der MSC aus KM wird in der Bildung einer Homöostase und Nische für HSZ gesehen. So infundierten Muguruma und Kollegen fluoreszenzmarkierte humane MSC direkt in das Knochenmark von NOD/SCID-Mäusen (nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency) und sahen Hinweise darauf, dass diese Zellen an spezifisch Orten anwachsen, sich an der Bildung der Knochenmarkumgebung beteiligen und das Engraftment von HSZ-Transplantaten fördern (Muguruma et al. 2006). MSC aus KM bilden mit den hämatopoetischen Stammzellen eine funktionelle Einheit und Nische im Knochenmark (Méndez-Ferrer et al. 2010).

Die Erstbeschreibung von MSC erfolgte 1966 durch Friedenstein als „fibroblastenähnliche Elemente“. Er beobachtete in vitro die Entstehung von Knochen aus in Diffusionskammern eingebrachten Knochenmarkfragmenten und Knochenmarkzellsuspensionen von Mäusen und vermutete das Vorhandensein einer von der Hämatopoese unabhängigen Stammzelle für das Knochenmarkstroma, die er als „colony forming unit-fibroblasts“ (CFU-F) bezeichnete (Friedenstein et al. 1966, 1970).

Neben Osteozyten konnte die Entwicklung von Chondrozyten und Adipozyten aus den Plastik-adhärenenten Knochenmarkzellen gezeigt werden (Friedenstein et al. 1970, Friedenstein 1976, Ashton et al. 1980, Owen 1988, Caplan 1991, Pittenger et al. 1999). Auch die Entwicklung von Muskelzellen (Wakitani et al. 1995, Ferrari et al. 1998) sowie Kardiomyozyten (Orlic et al. 2001) konnte nachgewiesen werden. Zudem vermuten verschiedene Autoren, dass aus MSC auch Zellen nicht-mesodermalen Ursprungs wie Neurozyten (Sanchez-Ramos et al. 2000) und Hepatozyten (Petersen et al. 1999) entstehen können.

Daher etablierte sich die durch Caplan in den 1990er Jahren geprägte Bezeichnung der MSC als „mesenchymal stem cells“ (Caplan 1991).

Der Begriff „Stammzelle“ beinhaltet die Eigenschaft zur Selbsterneuerung und pluripotenten Differenzierungskapazität in vivo. Weitere Bezeichnungen wurden synonym für die Zellen benutzt, wie „marrow stromal cells“, „bone marrow stromal cells“ sowie „mesenchymal stromal cells“. Heute geht man davon aus, dass Caplans Begriff der „Stammzelle“ nicht unvoreingenommen für in vitro kultivierte heterogene Präparationen aus Knochenmark und anderen Quellen angenommen werden kann und zieht daher den Begriff der Stromazelle vor. Postuliert wird, dass mesenchymale Stammzellen Teil der Stromazellpopulation sind (Horwitz et al. 2005). So ist in der Literatur die Abkürzung MSC sowohl für „mesenchymale Stromazelle“ als auch „mesenchymale Stammzelle“ gebräuchlich. Es wird zudem von einigen Autoren die Existenz verschiedener primitiverer Subpopulationen der mesenchymalen Stromazelle vermutet, die „multipotent adult progenitor cells“ (MAPC), „marrow isolated adult multilineage inducible cells“ (MIAMI) oder „multipotent adult stem cells“ (MASC). Dieser spezielle Subtyp zeichnet sich durch ein höheres Proliferationspotential als auch durch Multipotenz aus und nimmt einen Status zwischen Stamm- und Stromazelle ein (Jiang et al 2002, D'Ippolito et al 2004, Beltrami et al 2007). In der hier vorliegenden Arbeit wird unter der Abkürzung MSC die Begrifflichkeit der „mesenchymale Stromazelle“ verstanden.

2.4.1 Eigenschaften von MSC

Die meisten Erkenntnisse bezüglich der Morphologie sowie der physikalischen Eigenschaften, Phänotyp und Funktion ergeben sich aus in-vitro Versuchen mit MSC-Kulturen und bleiben damit Hypothesen in Bezug auf die Eigenschaften und Funktionen dieser Zellen in vivo. Die Adhärenz an Plastikoberflächen wurde zuerst von Friedenstein et al. 1976 beschrieben. Morphologisch zeigen sich MSC in der Kultur unterschiedlich von schmal und spindelförmig bis groß und polygonal. Mikroskopisch sichtbar sind sowohl granulierte als auch nicht granulierte Zellen (Friedenstein et al. 1966, Mets et al 1981, Colter et al 2000, Bianco et al 2001). Mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern kann der Phänotyp einer Zelle mit Hilfe der Durchflusszytometrie (engl. fluorescence activated cell sorting, FACS) näher bestimmt werden. Bisher wurden für MSC jedoch keine spezifischen Marker ausfindig gemacht. Man kennt aber eine Reihe unspezifischer Marker auf MSC sowie

Oberflächenantigene, welche von MSC nicht exprimiert werden. Tabelle 1 zeigt eine Auswahl von bisher untersuchten Markern und lässt zudem erkennen, dass es in der Literatur kontroverse Angaben bezüglich der positiven oder negativen Ausprägung der CD-Moleküle und Oberflächenmarker gibt.

Dominici und Kollegen haben in einem Positionspapier der Internationalen Society for Cellular Therapy (ISCT) eine Kombination bestimmter Oberflächenmarker als Teil ihrer Kriterien zur Identifikation von MSC festgelegt: Sie sind negativ für den Pan-Leukozytenmarker CD45, die hämatopoetischen Oberflächenantigene CD34 (auf hämatopoetischen Vorläuferzellen und Endothelzellen), CD14 oder CD11b (auf Monozyten und Makrophagen), sowie CD79 oder CD19 (auf B-Lymphozyten). Auch HLA-DR wird im nicht aktivierten Zustand nicht exprimiert, jedoch exprimiert werden CD105, CD73 und CD90 (Dominici et al. 2006).

Tabelle 1: Ausprägung von Oberflächenmarkern auf MSC

Oberflächenmarker und –ausprägung auf MSC		Literatur	Bemerkungen
CD105	+	Barry et al. 1999	Endoglin, TGF- β -Rezeptor, auch auf weiteren Zellen wie Endothelzellen, frühen Vorstufen von B-Lymphozyten oder Proerythroblasten
CD73	+	Haynesworth et al. 1992	Ekto-5-Nukleotidase, auch auf Subpopulationen von B- und T-Zellen
	-	Bayati et al. 2013	
CD90	+	Pittenger et al. 1999	Thy-1, auch auf aktivierten Endothelzellen und Fibroblasten
CD117	+	Y.-L. Si et al. 2011	c-kit, SCF-Rezeptor, auch auf hämatopoetischen Progenitoren
	-	Baddoo et al. 2003	
Stro-1	+	Simmons et al. 1991	auch auf Erythroblasten
	-	Colter et al. 2000	
SSEA-4	+	Gang et al. 2007	
Hämatopoetische/endotheliale Marker			
CD45	-	Dominici et al. 2006	Pan-Leukozytenmarker
CD34	-	Dominici et al. 2006	auf hämatopoetischen Vorläuferzellen und Endothelzellen
CD14	-	Potian et al. 2003	auf Monozyten und Makrophagen
CD11b	-	Dominici et al. 2006	auf Monozyten und Makrophagen
CD79	-	Dominici et al. 2006	auf B-Lymphozyten
CD19	-	Dominici et al. 2006	auf B-Lymphozyten
Immunphänotyp			
CD80	-	Tse et al. 2003	
CD86	-	Tse et al. 2003	
CD40	-	Tse et al. 2003	
Fas-Ligand	-	Le Blanc et al. 2003	
MHCI	+	Tse et al. 2003	
MHCII	-	Tse et al. 2003	
	+	Potian et al. 2003	

Die Fähigkeit von MSC zur Immunmodulation wurde in zahlreichen in vitro-Experimenten untersucht. Dennoch sind die genauen Mechanismen, wie MSC das Immunsystem beeinflussen, nicht vollständig verstanden. Wie schon erwähnt, exprimieren MSC HLA-Klasse-I-Antigene, jedoch keine oder nur geringe Mengen von MHC-Klasse-II-Molekülen. Auch costimulatorische Moleküle der B7- Gruppe (CD80, CD86) oder CD40 konnten nicht nachgewiesen werden (Tse et al. 2003, Le Blanc et al. 2003). Daher nehmen viele Autoren an, dass MSC keine Alloreaktion herbeiführen. Unabhängig von ihren HLA-Eigenschaften wurde festgestellt, dass MSC in der Lage sind, die T-Zellproliferation in der MLR zu unterdrücken (Di Nicola et al. 2002, Bartholomew et al. 2002). In daraufhin zahlreich folgenden in vitro-Studien konnten Hinweise auf die Mechanismen der Immunmodulation durch MSC gesammelt werden. So haben sie Einfluss auf das adaptive, aber auch das angeborene Immunsystem und agieren sowohl über Zellkontakt-abhängige Vorgänge als auch Zytokine, Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO), Prostaglandin E-2 (PGE-2), Transforming growth factor β (TGF- β), TNF-stimulated gene 6 protein (TSG-6) und Stickstoffmonoxid (English 2012).

MSC unterdrücken nicht nur direkt die T-Zellfunktion und T-Zell-Apoptose (Ren et al. 2008, Akiyama et al. 2012), sondern beeinflussen auch die Differenzierung von T-Helferzellen und induzieren die Entwicklung von T-regulatorischen Lymphozyten (Kong et al. 2009, Burr et al. 2013). Besonders die Beeinflussung der Treg-Population ist von großem klinischen Interesse, da sie eine Schlüsselrolle in der Toleranzentwicklung spielen und zur Behandlung der GvHD, sowie auch von Autoimmunkrankheiten dienen könnten. Wie MSC B-Zellen modulieren wird kontrovers diskutiert (Comoli et al. 2008, Rasmusson et al. 2007).

Die Effekte auf das angeborene Immunsystem sind vielfältig. Beispielsweise beeinflussen MSC laut mehrerer Autoren die Funktionen dendritischer Zellen und Monozyten/Makrophagen hin zu antiinflammatorischen und toleranzinduzierenden Phänotypen (Kim und Hematti 2009, Zhang et al. 2009). Zudem können sie auch modulierend auf NK-Zellen und noch weitere Komponenten der angeborenen Immunität wirken (Aggarwal und Pittenger 2005, Spaggiari et al. 2006, English und Wood 2013).

2.4.2 MSC in der klinischen Anwendung

Aus Voruntersuchungen für einen klinischen Einsatz ergaben sich Hinweise, dass MSC sowohl antiinflammatorische als auch regenerative Funktionen innehaben könnten. Die Ergebnisse von vivo-Modellen sind kontrovers. Bartholomew stellte fest, dass MSC-Infusionen vom Spendertier das Überleben allogener Hauttransplantate bei Pavianen verlängerten (Bartholomew et al. 2002). Polchert et al. als auch Ren et al. zeigten am GvHD-Maus-Modell, dass infundierte MSC die GvHD reduzieren können (Polchert et al. 2008, Ren et al. 2008), wohingegen Sudres und Kollegen keinen Effekt auf die GvHD bei Mäusen entdeckten (Sudres et al. 2006). Sasaki et al. vermuten anhand ihrer Forschungsergebnisse am Mausmodell, dass MSC durch Zytokine zum Ort der Inflammation migrieren und zudem die Fähigkeit zur Geweberegeneration an Hautwunden besitzen (Sasaki et al. 2008).

Lazarus et al. testeten erstmals die Sicherheit der intravenösen Applikation von MSC an 15 Patienten mit malignen Knochenmarkerkrankungen in kompletter Remission, wobei es zu keinen Nebenwirkungen kam, allerdings handelte es sich um ausschließlich autologe Infusionen (Lazarus et al. 1995). Bei Koç und Mitarbeitern zeigten sich nach Coinfusion autologer MSC zu peripheren Blutstammzellen (PBSZ) nach myoablativer Therapie bei Brustkrebspatientinnen ebenfalls keine toxischen Nebenwirkungen. Die Regeneration des Knochenmarks verlief rasch, wobei hier keine Kontrollen ohne MSC-Coinfusion gemacht wurden (Koç et al. 2000). 1999 transplantierten Horwitz et al. Knochenmark bei drei Kindern mit Osteogenesis imperfecta, einer genetisch bedingten Erkrankung, bei der die Funktion der mesenchymalen Zellen gestört ist, was zu fehlerhafter Knochenmatrix führt. Sie interpretierten die verbesserte Knochenmineralisierung nach KMT als erfolgreiches Anwachsen der im Transplantat enthaltenen MSC (Horwitz et al. 1999). Ursprünglich wurden große Hoffnungen auf einen Einsatz der MSC im Bereich des Tissue engineering, des Gewebersatzes, gesetzt. In einer der ersten klinischen Studien am Menschen wurden autologe MSC ex vivo auf einer Hydroxyapatitgerüst expandiert und erfolgreich in große Knochendefekte an langen Röhrenknochen implantiert (Quarto et al. 2001).

2.4.2.1 MSC und hämatopoetische Stammzelltransplantation

Mit der Entdeckung, dass MSC einen modulierenden Einfluss auf das Immunsystem haben könnten (Di Nicola et al. 2002), konzentrierte sich das Feld der klinischen Versuche auf die GvHD-Behandlung. In einer ersten Fallstudie konnten Le Blanc et al. einen neunjährigen Jungen mit schwerer akuter GvHD Grad IV mit haploidentischen MSC erfolgreich behandeln (Le Blanc et al. 2004). Es folgte eine Pilotstudie von Ringden et al., in der sechs von acht Patienten von der MSC-Gabe profitieren konnten (Ringden et al. 2006). In einer Phase II-Studie von Le Blanc et al. zeigte mehr als die Hälfte der Patienten mit einer steroid-refraktären GvHD von MSC-Infusionen eine klinische Besserung. Dabei waren HLA-identische MSC genauso wirksam wie haploidentische oder nicht identische (Le Blanc et al. 2008). Im Gegensatz dazu wurde 2009 eine Phase III-Studie durch die Osiris Therapeutics, Inc. in den USA initiiert, eine Firma, welche MSC in kommerziellem Umfang produziert. GvHD-Patienten wurden mit MSC behandelt und mit einer Placebogruppe verglichen. Dabei stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen heraus. Lediglich in Einzelgruppen, nämlich bei der Behandlung pädiatrischer Patienten und bei der Behandlung der GvHD der Leber konnten signifikante klinische Besserungen aufgezeigt werden (Martin et al. 2010).

Ob das Engraftment hämatopoetischer Stammzellen durch MSC unterstützt werden kann, ist ebenfalls im Blickpunkt einiger Studien, jedoch mit divergenten Ergebnissen. In der Arbeit von Koç zeigt sich eine gute Recovery durch unterstützende Gabe von autologen MSC nach Hochdosis-Chemotherapie (Koç et al. 2000) und weitere Autoren veröffentlichten Studien, in denen eine ähnlich gute hämatopoetische Erholung nach allogener HSZT mit Gabe von allogenen MSC nachgewiesen werden konnte (Lazarus et al. 2005, Ball et al. 2007, Sánchez-Guijo et al. 2012). Bernardo wie auch Gonzalo-Daganzo konnten das Engraftment von PRB-Transplantaten mit MSC dagegen nicht verbessern (Gonzalo-Daganzo et al. 2009, Bernardo et al. 2011). Dies untermauernd zeigten mehrere Autoren, dass das Knochenmarkstroma aus autologen Zellen rekonstituiert wird, jedoch nicht aus infundierten Spender-MSK (Koç et al. 1999, Rieger et al. 2005).

Weitere klinische Versuche mit MSC finden auch in anderen Gebieten der Medizin statt, wie zum Beispiel in der Orthopädie für einen Knochen- und Knorpelersatz, in der Kardiologie zur Regeneration und Immunmodulation nach Myokardinfarkt, in der Gastroenterologie bei Leberzirrhose, aber auch Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn und Systemischer Lupus erythematodes hofft man, besser behandeln zu können (Kim et al. 2013).

2.4.3 Quellen für mesenchymale Stromazellen

MSC konnten, außer aus Knochenmarkaspiraten, auch aus weiteren adulten Geweben wie Fettgewebe (Zuk et al. 2001), Sehne (Salingarnboriboon et al. 2003), Synovialmembran (Bari et al. 2001), Herz (Beltrami et al. 2003), Zähnen (Gronthos et al. 2002, Miura et al. 2003) und Haut (Shih et al. 2005) isoliert werden. Auch aus Geweben perinatalen Ursprungs wie Plazentarestblut, Nabelschnurblut und Whartonscher Sulze konnten MSC gewonnen werden (Yen et al. 2005, Erices et al. 2000, La Rocca et al. 2009). Von einigen Autoren wird vermutet, dass sich MSC in nahezu allen peripheren Geweben nachweisen lassen, da sie in vivo in einer perivaskulären Zone „zu Hause“ seien (da Silva Meirelles et al. 2006, Crisan et al. 2008).

2.4.4 Verfahren zur Isolierung und Kultur von MSC

MSC sind in allen Geweben nur in einer sehr geringen Konzentration vorhanden. Eine Anreicherung und Vermehrung durch geeignete Isolierungs- und Kulturmethoden sind deshalb für einen klinischen Einsatz dieser Zellen essentiell. Dabei sollte die gewünschte Zellzahl in möglichst kurzer Zeit erreicht werden können, ohne dass die MSC jedoch in Phänotyp und funktionellen Eigenschaften alteriert werden. Zudem darf das resultierende Produkt keine Risiken für die Anwendung am Menschen bergen. Bisher gelten keine allgemeingültigen Vorgaben bezüglich der Methoden zur Isolierung und Kultur von MSC, was auch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Studiengruppen erschwert.

Viele Forscher nutzen allein die Plastikadhärenz der MSC aus unfraktioniertem Knochenmark oder anderen MSC-Quellen und entfernen schrittweise nicht-

adhärente Zellen aus der Kultur. Zu den MSC-anreichernden immunologischen Methoden zählen Positiv- und Negativselektionen, zum Beispiel mittels immunomagnetischer Beads oder durch FACS. Es können damit zum einen Zellen der hämatopoetischen Linie aussortiert werden und/oder durch Positivselektion MSC anhand ihrer bekannten Oberflächenantigene angereichert werden. Simmons und Torok-Storb nutzten den monoklonalen Antikörper Stro-1 in Kombination mit einer Glycophorin A-negativ-Selektion, um Knochenmarkstromazellen zu isolieren (Simmons und Torok-Storb 1991). Diese Stro-1-positive Zellfraktion stellt laut Stewart einen primitiveren Subtyp der MSC dar (Stewart et al. 2003) und hat möglicherweise stärkere immunsuppressive Eigenschaften (Nasef et al. 2009). Durch negativ-Selektion haben Tondreau und Kollegen ebenfalls MSC-Kulturen erfolgreich angereichert (Tondreau et al. 2004).

Die in vitro-Expansion von MSC erfolgt bisher vorrangig auf Plastikoberflächen. Aufgrund von Bedenken, dass diese artifizielle Umgebung die MSC in Phänotyp und Funktionalität beeinträchtigen könnten, wird versucht, MSC mit Hilfe von Extrazellulär-Matrix-Bestandteilen wie Fibronektin, Gelatine, Kollagen oder Laminin zu kultivieren (Dänmark et al. 2012). Werden serumfreie Kulturmedien verwendet, müssen die Kulturgefäße mit ECM-Komponenten zur Förderung der Zelladhäsion beschichtet werden. Aber auch synthetische Materialien kommen zum Einsatz (Dolley-Sonneville et al. 2013).

Auch bezüglich des zu verwendenden optimalen Kulturmediums besteht kein Konsens. Die meisten klinischen Studien mit MSC nutzen bisher Medien unter Zugabe von fetalem Kälberserum (FKS). Hierbei besteht jedoch die Gefahr der Immunisierung gegen tierische Antigene und Übertragung pathogener Keime. Alternativ verwendet man autologes oder allogenes humanes Serum oder serumfreie Medienzusätze und humanes Plättchenlysat unter Zugabe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen (Tonti und Mannello 2008).

2.4.5 Zur Sicherheit der klinischen Anwendung

Allgemeingültige Standards für die Gewinnung, Kultivierung und Applikation der mesenchymalen Stromazellen sind notwendig. MSC zählen in Europa als „Arzneimittel für neuartige Therapien“, für welche die Verordnung Nr. 1394/2007 gilt. Darin sind Vorschriften, betreffend die Genehmigung für das Inverkehrbringen, die Kennzeichnung und die Pharmakovigilanz festgelegt. Zudem soll die Herstellung in Einklang mit den Grundsätzen der guten Herstellungspraxis (engl. good manufacturing practice, GMP) erfolgen. Diese sind in der Richtlinie 2003/94/EG festgesetzt und detailliert in einem Leitfaden für die gute Herstellungspraxis veröffentlicht. Dieser enthält Festlegungen bezüglich der Räumlichkeiten und Ausrüstung, der Qualitätssicherung und -kontrolle, sowie der Qualifizierung des Personals, die zur Produktion von klinisch eingesetzten Zellpräparaten nötig sind.

Von der Sicherheit der intravenösen Applikation ohne akute toxische Nebenwirkungen wird im Konsens der bisher durchgeführten Studien ausgegangen. Auch ektope Gewebeentstehung oder Tumorentstehung nach MSC-Applikation wurden nicht gesehen (von Bahr et al 2012).

Im Großteil der klinischen Versuche werden allogene MSC von Drittspendern verwendet. Dies setzt voraus, dass MSC nicht vom Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt werden. Es gibt eine Reihe von Arbeiten, die auf eine Alloreaktivität hinweisen (Eliopoulos et al. 2005, Nauta et al. 2006, Cho et al. 2008). Weiterhin wird von einigen Autoren befürchtet, MSC könnten Tumorstadium begünstigen, indem sie mit Tumorzellen interagieren oder eine Abschwächung des GvL-Effektes nach HSZT bewirken (Zhu et al. 2006, Ning et al. 2008).

3 Ziele der Arbeit

Für den klinischen Einsatz von MSC zur Behandlung der akuten GvHD nach allogener HSZT werden Zellen in der Größenordnung von $1-2 \times 10^6/\text{kg}$ Körpergewicht einmalig oder auch wiederholt intravenös appliziert (Ball et al. 2013). Das bedeutet, für einen pädiatrischen Patienten mit einem Gewicht von 30kg müssen für eine einmalige Dosis etwa $0,5 \times 10^8$ Zellen vorgehalten werden.

Da der Spender des Transplantates innerhalb von wenigen Wochen für eine zweite Spende nicht zur Verfügung steht, könnte die Nutzung von MSC aus PRB, das jederzeit mit einem geschlossenen Abnahmesystem gewonnen werden kann, als Alternative in Betracht gezogen werden.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte zum einen geprüft werden, ob es Isolierungsmethoden gibt, mit denen sich reproduzierbar MSC aus PRB für einen klinischen Einsatz gewinnen lassen, die unter prä-GMP-Bedingungen expandiert werden können. Zum anderen sollte getestet werden, ob ein Einsatz von MSC unabhängig von den HLA-Grenzen vertretbar ist. Dann könnten kryokonservierte Zellen aus einer Zellbank eingesetzt werden, die gut planbar zum gewünschten Zeitpunkt einsatzbereit wären.

Folgende Fragestellungen bildeten daher die Grundlage der Arbeit:

- Welche Kulturbedingungen unter Verwendung GMP-konformer Materialien sind geeignet, MSC in ausreichenden Mengen zu expandieren?
- Mit welchen Separationsmethoden können MSC aus Plazentarestblut reproduzierbar gewonnen werden?
- Können MSC unabhängig von HLA-Grenzen angewendet werden?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Medien, Puffer, Zusätze

Tabelle 2: Medien, Puffer und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller/Zusammensetzung
Puffer	
PBS-Puffer pH 7,3	Serag Wiessner GmbH&Co.KG, Naila
PBS/EDTA	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
PBS/HSA/EDTA	PBS/EDTA + HSA 20µl/ml
Kulturbedien	
Medium-Zusätze „Standard“	FKS 15%, EGF (10µl/ml), bFGF (1µl/ml), SCF (4µl/ml), Glutamin (6µl/ml), Streptomycin (2,4µl/ml), Penicillin (1,2µl/ml)
IMDM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim am Albuch
IMDM-FKS-Medium	IMDM , 15% FKS , 6µl/ml Glutamin , 2,4µl/ml Streptomycin, 1,2µl/ml Penicillin
IMDM-PRB-FKS-Medium	IMDM, 5% PRB-Serum, 5% FKS, 6µl/ml Glutamin, 2,4µl/ml Streptomycin, 1,2µl/ml Penicillin, 10µl/ml EGF, 1µl/ml bFGF, 10µl/ml PDGF, 4µl/ml SCF
RPMI	Biochrom GmbH, Berlin
RPMI-FKS-Medium	RPMI, 10% FKS, 6µl/ml Glutamin, 2,4µl/ml Streptomycin, 1,2µl/ml Penicillin
RPMI-huS-Medium	RPMI, 5% huS, 6µl/ml Glutamin, 2,4µl/ml Streptomycin, 1,2µl/ml Penicillin
Seren/FFP/Serumsupplement	
Human-Albumin Kabi 20%	Octapharma GmbH, Dessau-Roßlau
BSA 10%	WAK- Chemie Medical GmbH, Steinbach/Ts.
FKS	Biochrom GmbH, Berlin
AB-Serum	Universitätsklinikum Jena, Institut für Transfusionsmedizin
FFP	Universitätsklinikum Jena, Institut für Transfusionsmedizin
Serumsupplement: BIT 9500 Serum Substitute	Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Kanada

Humanserum, gepoolt	Universitätsklinikum Jena, Institut für Transfusionsmedizin
PRB-Serum, gepoolt	Universitätsklinikum Jena, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtsmedizin
Kulturzusätze	
N-Acetyl-L-ALANYL-L-glutamine 200mM	Biochrom GmbH, Berlin
Streptomycin (1g in 10ml)	Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena
Penicillin-G (0,3g in 10ml)	Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena
Wachstumsfaktoren	
PDGF	PeproTech GmbH, Hamburg
rh EGF (recombinant, human)	PeproTech GmbH, Hamburg
rh bFGF	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
rh SCF	PeproTech GmbH, Hamburg
rh IL-2	PeproTech GmbH, Hamburg
Beschichtungssubstanzen	
Kollagen Typ 1 aus Rattenschwanz 1mg/ml Kollagenlösung: 1ml in 10ml aqua, dest.	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fibronectin, human	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
EDB	Universitätsklinikum Jena, Institut für Pathologie
Sonstige Chemikalien	
SBA	Vector Laboratories Inc., Burlingame, Vereinigte Staaten
Galaktoselösung (360mg in 10ml PBS)	Universitätsklinikum Jena, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare GmbH, Solingen
Trypsin-EDTA Solution	Life Technologies GmbH, Darmstadt
DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach Ts.

4.1.2 Antikörper, Beads, Färbesubstanzen

Tabelle 3: Antikörper, Beads, Färbesubstanzen

Bezeichnung	Hersteller/Herkunft
Antikörper zur Zellisolierung	
UCHT-1	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
CD16-AK	Dianova GmbH, Hamburg
Stro-1-AK (20µg/ml)	Hergestellt aus Stro-1-Hybridom-Zelllinie von ATCC (American tissue and cell culture); produziert, aufgereinigt und konzentriert im Labor für Hämatologie und Onkologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena
Antikörper Durchflusszytometrie	
CD3- ECD (Anti-human)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CD4- FITC (Anti-human)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
CD4- PC5 (Anti-human)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CD8- FITC (Anti-human)	Caltag-Medsystems Ltd., Buckingham, Vereinigtes Königreich
CD14- FITC (Anti-human)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
CD16- PE (Anti-human)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
CD3/16.56- PC5 (Anti-human)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CD25- PC5 (Anti-human)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, Vereinigte Staaten
CD34- PE (Anti-human)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, Vereinigte Staaten
CD34- PC5 (Anti-human)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CD45- FITC (Anti-human)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark,
CD45- PC5 (Anti-human)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CD73- PE (Anti-human)	BD Biosciences, San Diego, Vereinigte Staaten
CD105- FITC (Anti-human)	AbD Serotec, ehem. MorphoSys AG, Martinsried
CD127- PE (Anti-human)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CD137- PE (Anti-human)	Miltenyi Biotec GmbH
GlyA- PE (Anti-human)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SSEA-4- FITC (Anti-human)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
7AAD	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
3-Farbkontrolle	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

IgG1-ECD (Anti-human)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Antikörper/Substanzen LSAB-Färbung	
CD105 (Mouse-Anti-human)	AbD Serotec, ehem. MorphoSys AG, Martinsried
CD73 (Anti-human)	BD Biosciences, San Diego, Vereinigte Staaten
CD45 (Anti-human)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
CD117 (Anti-human)	BD Biosciences, San Diego, Vereinigte Staaten
SSEA-4-antibody (Anti-human)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Stro-1	Hergestellt aus Stro-1-Hybridom-Zelllinie von ATCC (American tissue and cell culture); produziert, aufgereinigt und konzentriert im Labor für Hämatologie und Onkologie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena
Sekundärantikörper Goat-anti-mouse/rabbit-biotinyliert	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dako REAL™ Antibody Diluent	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Hämalaunlösung nach Mayer	Merck KGaA, Darmstadt
Glycergel	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dako REAL™ Detection System Chromogen (RED)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Streptavidin-alkalische Phosphatase-Lösung	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Antikörper/Substanzen ELIBEADS-und BrdU-Assay	
Catch-AK Klon MD1(1mg/ml), Detection-AK 4S.B3-biotinyliert (0,5mg/ml)	eBioscience Inc., San Diego, CA, Vereinigte Staaten
Streptavidin-PC5-Cy5.5	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, Vereinigte Staaten
rh IFN-Standard	eBioscience Inc., San Diego, CA, Vereinigte Staaten
Cell proliferation ELISA, BrdU (Kit mit BrdU, Fixdenat, Anti-BrdU-POD, TMB)	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz
1% H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim am Albuch
Beads zur Zellisolierung	
Dynabeads® M-450 Sheep ant-Mouse IgG	Invitrogen Dynal AS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Vereinigte Staaten)
CD45 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Glycophorin A MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Rat Anti-Mouse IgM MicroBeads MACS®	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach

4.1.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Gewebekulturflaschen Cellstar® 250ml, 40ml	Greiner Bio-one GmbH, Leipzig
96-, 12-, 6-Loch-Lochplatten	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Vereinigte Staaten
PP-Test-Tubes Cellstar® 50ml, 15ml	Greiner Bio-one GmbH, Leipzig
Cell Culture Tubes Cellstar® 12ml	Greiner Bio-one International AG, Kremsfeld, Österreich
MACS® Separation Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
PP-PCR-Tubes 0,2ml	Greiner Bio-one GmbH, Leipzig
Glasobjektträger, Deckelgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Cytopen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

4.1.4 Geräte

Tabelle 5: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Laminarbox Hera safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Rotixa 120R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Cytospin 4 Cytocentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Vereinigte Staaten
Inkubator IG150 Jouan	JOUAN GmbH
Cell Counter Coulter® Act diff™	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Tecan SLT Spectra III Mikroplattenreader	SLT Lab Instruments GmbH, Berlin
Flow Cytometer Coulter® Epics® XL-MCL™	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Mikroskop Nikon Eclipse TE200	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop Nikon Eclipse E400	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop Olympus CK2	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Vario MACS® Magnet	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
MACSiMAG™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach
Vortexer	Scientific Industries Inc., New York, Vereinigte Staaten
Neubauer-Zählkammer	VEB Carl Zeiss Jena

4.1.5 Software

Tabelle 6: Software

Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometrie	
WINMDI2.8	Purdue University, West Lafayette, IN, Vereinigte Staaten
Statistik	
PASW Statistics 18	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
Office Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten

4.1.6 Zellmaterial

Tabelle 7: Zellmaterial

Bezeichnung	Herkunft
Plazentarestblut	Universitätsklinikum Jena, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, abgenommen nach reifen Spontangeburt
Knochenmark	Universitätsklinikum Jena, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin; freiwillige, gesunde Spender
Buffy coats	Universitätsklinikum Jena, Institut für Transfusionsmedizin; freiwillige, gesunde Spender

4.2 Methoden

4.2.1 Aufbereitung der Seren

Serummonovetten wurden abzentrifugiert, der zellfreie Überstand abgenommen, gepoolt und bei 56°C im Wasserbad über eine halbe Stunde inaktiviert und in Portionen bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

4.2.2 Aufbereitung der Zellpräparationen

Plazentarestblut wurde nach der Geburt entnommen, die Erythrozyten durch Dextran-vermittelte Sedimentation abgetrennt und die kernhaltigen Zellen mit 5%

DMSO kryokonserviert. Mit dem KM-Material wurde nach Abnahme wie mit PRB verfahren.

Buffy coats für die mixed lymphocyte reaction (MLR) wurden aus Vollblutspenden gewonnen. Mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Paque™) wurden aus Buffy coats mononukleäre Zellen (MNC) isoliert. Die Lymphozyten und Monozyten sammelten sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/Thrombozyten) und Ficoll-Paque™ an. Die PBMNC wurden abgenommen, ein Teil wurde gepoolt und mit 30Gy zur Inaktivierung bestrahlt. Bestrahlter Pool und PBMNC der einzelnen Spender wurden dann portionsweise kryokonserviert.

4.2.3 Kryokonservierung

Die zu kryokonservierenden Zellen lagen mit einer Konzentration von $<2 \times 10^8$ Zellen/ml in PBS/HSA vor. Die Zellsuspension wurde 1:1 mit der Einfrierlösung (DMSO 10% in PBS/HSA) gemischt und portionsweise kryokonserviert.

4.2.4 Auftauen und Stabilisieren von Zellmaterial

Das gefrorene Zellmaterial wurde im Wasserbad bei 40°C aufgetaut, aus dem Beutel oder Einfrierröhrchen entnommen, in sterile PP-Test-Tubes 50ml überführt und einmal mit kaltem PBS gewaschen (vorgekühlte Zentrifuge 10min, 1850U/min, Temperatur 11°C). Das Pellet wurde in RPMI-FKS-Medium mit einer Zellkonzentration unter 8×10^6 /ml resuspendiert, in eine Gewebekulturflasche 250ml gegeben und im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht stabilisiert. Der Auftauvorgang erfolgte zügig und unter schonender Kühlung der Zellen auf Eis.

4.2.5 Separation von MSC aus Knochenmark

Die Zellen wurden aufgetaut, stabilisiert und in PBS/HSA/EDTA-Puffer aufgenommen.

- Zugabe von je 20µl CD45 MicroBeads und Glycophorin A MicroBeads zu 1×10^7 Zellen in 80µl PBS/HSA/EDTA; Inkubationszeit: 25min auf Eis unter regelmäßigem Mischen
- einmal mit PBS/HSA/EDTA waschen; Pellet in 2ml PBS/HSA/EDTA
- MACS® Separation Säule im Magnet (Vario MACS®) mit PBS/HSA/EDTA spülen, Zellsuspension aufgeben, Zielfraktion = Negativfraktion, nachspülen mit PBS/HSA/EDTA
- erhaltene Zielfraktion abzentrifugieren, in 2ml IMDM-PRB-FKS-Medium resuspendieren
- Bestimmung der Zellzahl
- Vor und nach Separation Bestimmung der Oberflächenmarker
- Ausgang: CD45/GlyA/CD34 und 3-Farbkontrolle
- nach Depletion: CD45/GlyA/7AAD und 3-Farbkontrolle

4.2.6 Separation von MSC aus Plazentarestblut

Für eine Anreicherung wurden fünf verschiedene Varianten mit aufgetautem, stabilisiertem Material durchgeführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in PBS/HSA/EDTA Puffer aufgenommen.

4.2.6.1 CD3-negativ-Depletion

- Zugabe von 30µl Antikörper UCHT-1 zu 1×10^8 Zellen
- 20min inkubieren, regelmäßig vorsichtig durchmischen
- einmal mit PBS/HSA/EDTA waschen
- Zugabe von 4×10^8 Schaf-Antimäus-Beads zu 1×10^8 Zellen
- 20min inkubieren
- Abtrennung der positiven Zellen und Beads im Vario MACS® Magneten
- CD3 negative Suspension abzentrifugieren
- In IMDM-PRB-FKS-Medium aufnehmen
- Zellzahl bestimmen

4.2.6.2 CD3-negativ-Depletion/ Stro-1-positiv-Selektion

- CD3-negativ-Depletion aller Zellen wie unter 4.2.6.1.

Stro-1-positiv-Selektion:

- Zugabe von 20µl Stro-1-Antikörper zu 1×10^7 Zellen in 100µl PBS/HSA/EDTA
- 10min inkubieren
- zweimal waschen mit PBS/HSA/EDTA
- Zugabe von 20µl Rat Anti-Mouse IgM Microbeads MACS® zu 1×10^7 Zellen in 80µl PBS/HSA/EDTA
- 10min inkubieren
- einmal waschen mit PBS/HSA/EDTA
- Pellet in 2ml PBS/HSA/EDTA aufnehmen
- Suspension über Magnetsäule (MACS® Separation Column und Vario MACS®) geben
- Zielfraktion=Positivfraktion nah Entfernen aus dem Magneten auswaschen
- Negativfraktion zur Kontrolle ebenfalls aufgefangen
- abzentrifugieren, Zellzahl bestimmen

4.2.6.3 CD3-negativ-Depletion/ CD16-negativ-Depletion

- Zugabe von 25µl CD-16-Antikörper und 30µl UCHT-1-AK zu 10^8 Zellen
- weiterer Ablauf wie in 4.2.6.1. beschrieben
- Abzentrifugieren, Zellzahl bestimmen

4.2.6.4 CD3-negativ-Depletion/ CD16-negativ-Depletion und CD45-negativ/ GlyA-negativ- Depletion

- CD3-negativ-/CD16-negativ-Depletion wie unter 4.2.6.3.
- Zugabe von je 20µl CD45 MicroBeads und Glycophorin A MicroBeads zu 1×10^7 Zellen in 80µl PBS/HSA/EDTA
- 25min auf Eis unter regelmäßigem Mischen inkubieren
- einmal mit PBS/HSA/EDTA waschen
- Pellet in 2ml PBS/HSA/EDTA aufnehmen

- MACS® Separation Säule im Magnet (Vario MACS®) mit PBS/HSA/EDTA spülen, Zellsuspension aufgeben
- Zielfraktion=Negativfraktion mit PBS/HSA/EDTA ausspülen
- abzentrifugieren, Zellzahl bestimmen

4.2.6.5 Separation mittels Sojabohnenagglutinin

- Zellen abzentrifugieren und Pellet in PBS mit 2×10^8 Zellen/ml aufnehmen
- Zugabe von 1ml SBA-Lösung zu 2×10^8 Zellen
- Suspension gut mischen
- 5min inkubieren, dabei Agglutination
- langsam 3ml 5%ige BSA-Lösung/ 2×10^8 Zellen unter die Zellsuspension legen
- 10min inkubieren
- nicht agglutinierte Zellen an der Oberfläche abnehmen
- Zugabe von 5ml Galaktoselösung
- 5min inkubieren
- abzentrifugieren; Pellet nochmals mit 5ml Galaktoselösung resuspendieren
- 5min inkubieren
- abzentrifugieren, Zellzahl bestimmen

4.2.7 Kultivierung der PRB-Präparationen

Zur Beschichtung der Kulturgefäße wurde Kollagenlösung 1:1 mit PBS verdünnt und 7µl/ml Fibronectin zugegeben. In eine Gewebekulturflasche 40ml (25cm²) wurde 1ml dieser Lösung bodendeckend aufgebracht und zur Ausbildung eines Kollagen-Fibronectinfilms eine Stunde belassen. Der flüssige Überstand wurde entfernt und der verbleibende Film trocknete etwa 24 Stunden bevor Zellmaterial aufgebracht werden konnte. Die Einsaat der separierten Zellen erfolgte mit einer Zelldichte von 4 bis 12×10^5 Zellen/cm². Die Kulturflaschen inkubierten bei 37°C im Brutschrank.

Ein- bis zweimal pro Woche wurde das Nährmedium zur Hälfte durch frisches IMDM-PRB-FKS ersetzt. Zeigte sich eine Konfluenz der Zellen von 70 bis 90%, wurden sie passagiert: die adhärennten Zellen wurden mittels Trypsin abgelöst und in frische Kollagen-Fibronectin-beschichtete 40ml-Gewebekulturflaschen eingesät.

4.2.8 Kultivierung der KM-Präparationen

Die separierten Zellen wurden in die vorbereiteten Kulturgefäße (12-Lochplatten/6-Lochplatten) mit 1×10^4 Zellen/cm² unter Zugabe von 1 bzw. 2ml IMDM-PRB-FKS-Medium bzw. Variationen von Kulturmedien und Zusätzen eingesät und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Tag sieben wurde die Anzahl der entstandenen Spots mit Hilfe des Mikroskops Olympus CK2 festgestellt. Ein Spot ist dabei definiert als Ansammlung von mindestens drei Zellen bis hin zu kleineren Zellkolonien. Frisches Medium wurde zugegeben. Am Tag vierzehn wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

4.2.9 Charakterisierung der Zellen aus KM und PRB

Zur morphologischen Beurteilung der Kulturen wurden digitale Fotos mit Hilfe des Mikroskops Nikon Eclipse TE200 mit Hoffman-Modulationskontrast erstellt (mikroskopiert mit 100facher Vergrößerung). Zum Nachweis charakterisierender Oberflächenmarker wurden die Zellen auf Objektträgern verbracht und angefärbt.

4.2.9.1 Anfertigung der Cytospins

1×10^5 Zellen werden in 100µl PBS als Spot auf den Objektträger aufgebracht und mit Hilfe der Cytospinzentrifuge in einer dünnen Schicht verteilt.

4.2.9.2 Cytochemische Färbung (LSAB-Labeled Streptavidin-Biotin-Methode)

- angefertigte Cytospins auf Objektträgern bei Raumtemperatur vorliegend
- Fixierung der Zellen mittels Aceton
- Cytospins auf Objektträger mit Cytopen einkreisen, trocknen lassen
- unspezifische Antigenblockierung mit 50µl Dako Diluent Blocking Solution pro Cytospin, 15min inkubieren
- Flüssigkeit abkippen, vorsichtig trocknen
- Primärantikörper auftragen mit je 50µl, dafür Antikörpervedünnungen verwenden:
 - 5µl CD105 in 50µl Dako Diluent
 - 10µl CD73 in 50µl Dako Diluent
 - 5µl CD117 in 50µl Dako Diluent

- 3µl CD45 in 50µl Dako Diluent
- 3µl SSEA-4 in 50µl Dako Diluent
- 5µl Stro-1 in 50µl Dako Diluent
- 30min inkubieren
- 2x je 5min waschen mit PBS im Becherglas
- 50µl Sekundärantikörper (goat-anti-mouse/rabbit- biotinyliert) auftragen und 30min inkubieren
- 2x waschen
- 50µl Streptavidin-alkalische Phosphatase auftragen und 30min inkubieren
- 2x je 5min waschen mit PBS im Becherglas
- Chromogenlösung mit Dako REAL™ Detection System Chromogen (RED) nach Herstellerangaben ansetzen und 50µl Chromogenlösung pro Cytospin auftragen
- 1x waschen
- Gegenfärbung mit Hämatoxylin, 1min inkubieren
- abkippen und 5min in Leitungswasser spülen
- trocknen lassen, Striche des Cytospins wegwischen
- Objektträger in erwärmter Glyceringelatine einbetten und Deckglas platzieren

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Mikroskops Nikon Eclipse E400 digital dokumentiert (Vergrößerung 100fach).

4.2.10 Optimierungsversuche der Kulturbedingungen für MSC

4.2.10.1 Modifizierung der Kulturgefäße durch Beschichtung mit ECM-Komponenten

Verschiedene Beschichtungsvarianten wurden in 6-Lochplatten vorbereitet wie in Tabelle acht schematisch zu sehen. Die jeweils aufgegebene Flüssigkeit wurde 30 Minuten belassen, dann abgenommen und die verbleibende Schicht trocknen gelassen. Als Kulturmedium wurde IMDM mit den Medium-Zusätzen „Standard“ verwendet.

Tabelle 8: Beschichtung mit ECM-Komponenten

ECM-Komponenten	Pipettierung
Kollagenschicht	500µl Kollagenlösung
Kollagenschicht mit Fibronectin	500µl Kollagenlösung + 4µl Fibronectin
Kollagenschicht mit Fibronectin/EDB	500µl Kollagenlösung + 4µl Fibronectin + 4µl EDB
Fibronectin	500µl PBS + 4µl Fibronectin
Fibronectin/EDB	500µl PBS + 4µl Fibronectin + 4µl EDB

4.2.10.2 Variation des Kulturmediums, der Seren/Serumersatzmittel und Wachstumsfaktoren

Die Beschichtung der Kulturgefäße erfolgte mit Kollagen/Fibronectin, wie in 4.2.10.1. beschrieben. Es wurden in aufeinanderfolgenden Schritten das Kulturmedium, Seren/Serumersatzmittel, Wachstumsfaktoren und die Zugabe eines synthetischen Serumsupplements variiert, wie in den Tabellen 9 bis 12 schematisiert.

Tabelle 9: Variation der Kulturmedien

Kulturmedium	weitere Zusätze
RPMI	Medium-Zusätze „Standard“
IMDM	

Tabelle 10: Variation der Seren/FFP

Serumvariation und FFP	weitere Zusätze
20%FKS	IMDM mit Medium-Zusätzen „Standard“
5%AB+10%FKS	
5%PRB+10%FKS	
10%AB	
5%AB+5%PRB	
5%PRB	
5%FKS+5%PRB	
5%PRB+10%AB	
5%PRB+10%FFP	
20%FFP	

Tabelle 11: Variation der Wachstumsfaktoren, Zugabe von 10µl/ml EGF, 1µl/ml bFGF, 10µl/ml PDGF, 4µl/ml SCF in verschiedenen Kombinationen

Wachstumsfaktoren	weitere Zusätze
SCF+bFGF	IMDM-FKS-PRB-Medium Wachstumsfaktoren ohne
SCF+bFGF+PDGF	
SCF+bFGF+EGF	
SCF+bFGF+EGF+PDGF	
EGF+PDGF	
EGF+bFGF	

Tabelle 12: Zugabe von Serumsupplement (1µl/ml)

Serumsupplement	weitere Zusätze
mit	IMDM-FKS-PRB-Medium
ohne	

4.2.11 Modifizierte gemischte Lymphozytenkultur zur Beurteilung der immunmodulatorischen Fähigkeiten von MSC

Kryokonservierte MSC aus KM und PRB wurden eine Woche vor Beginn der MLR aufgetaut und expandiert. Sie wurden für die MLR am Tag null mittels Trypsin abgelöst und für drei Durchläufe in drei verschiedenen Konzentrationen (5,10 und 15×10^3 Zellen/ml) zugegeben (MSC-/Responderzell-Verhältnisse von 1:67, 1:100 und 1:200). Die Responder- und bestrahlten Stimulator- MNC wurden aufgetaut, über Nacht stabilisiert und mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in RPMIhuS-Medium resuspendiert. Zur Verstärkung der MLR-Sensitivität wurden 10ng/ml SCF zugegeben.

Je 1ml Responder- und Stimulator-MNC wurden pro Tube pipettiert. Am Tag vier wurde 1ng/ml IL-2 hinzugefügt. Alle Proben wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Der Ablauf der Immuntests ist in Tabelle 13 dargestellt, die Probenpipettierung in Tabelle 14 veranschaulicht.

Tabelle 13: Zeitlicher Ablauf der MLR

	Tag -6	Tag -1	Tag 0	Tag +4	Tag +5	Tag +7
auftauen	x MSC	x MNC, Pool				
MLR			x			
+IL-2 (1ng/ml)				x		
FACS			x		x	x
ELIBEADS			x		x	x
BrdU						x

Tabelle 14: Übersicht Proben der MLR

	<i>Responderzellen</i> MNC Spender 1x10 ⁶ Zellen/ml	<i>Stimulatorzellen</i> MNC Pool 1x10 ⁶ Zellen/ml	<i>Modulatorzellen</i> MSC aus PRB/KM A: 5x10 ³ Zellen/ml B: 10x10 ³ Zellen/ml C: 15x10 ³ Zellen/ml
Probe 1 Spender	X		
Probe 2 Spender+Pool	X	X	
Probe 3 Spender+MSC	X		A
Probe 4 Spender+MSC	X		B
Probe 5 Spender+MSC	X		C
Probe 6 Spender+Pool+MSC	X	X	A
Probe 7 Spender+Pool+MSC	X	X	B
Probe 8 Spender+Pool+MSC	X	X	C
Probe 9 Pool		X	

4.2.12 BrdU-Einbau-Assay

Zur Überprüfung der Reaktivität der Poolzellen wurde am Tag sieben ein BrdU-Proliferationsassay durchgeführt.

- 5x10⁶ Zellen/ml in IMDM-FKS-Medium aufnehmen und 100 µl/Loch in 96-Lochplatte pipettieren
- jeweils 10µl BrdU/Loch zugeben, dabei auch Negativkontrollen ohne BrdU belassen, 18h inkubieren
- Platte bei 1200U/min abzentrifugieren, Überstände verwerfen
- 3x mit PBS waschen
- 24h bei Raumtemperatur trocknen
- 50µl Fixdenat/Loch zugeben, 30min fixieren
- Überstand verwerfen
- 3x mit PBS/HSA waschen (bis pH-Neutralität)

- 20µl Anti BrdU-POD- Antikörper/Loch zugeben und 2h inkubieren
- 3x mit PBS waschen, Überstände verwerfen
- 100 µl TMB/Loch zugeben und 30min im Dunkeln inkubieren
- mit 50µl 1% H₂ SO₄ Reaktion stoppen
- Auswertung im Plattenreader bei 450nm

4.2.13 Durchflusszytometrische Analyse (FACS) der MLR

An den Tagen null, fünf und sieben wurden folgende Antikörper verwendet: CD4, CD127, CD25. Die Proben wurden wie in Tabelle 15 dargestellt pipettiert.

Tabelle 15: Übersicht Proben Durchflusszytometrie

	FITC-konjugierter Antikörper	PE-konjugierter Antikörper	PC5-konjugierter Antikörper
Probe	CD4 5µl	CD127 15µl	CD25 15µl
Kontrolle	3-Farbkontrolle 10µl		

- Antikörper zu je 5x10⁵ Zellen in 50µl zugeben, 20min inkubieren
- einmal mit PBS/HSA waschen, in 200µl PBS/HSA resuspendieren
- Messung der zellgebundenen Marker mit dem Flow Cytometer Coulter® Epics® XL-MCL™

4.2.14 ELIBEAD-Assay zur Analyse der MLR

In Tabelle 16 ist die Probenzusammenstellung übersichtlich dargestellt. Der Assay wurde wie folgt durchgeführt:

- 20.000/10.000 Testzellen in 50µl IMDM-FKS-Medium in 0,2ml PP-PCR-Tubes
- dazu 250.000 Beads in 50µl Kulturmedium geben und 18h bei 37°C kultivieren
- Beads mittels Vario MACS® Magneten von den Zellen trennen und 2x mit PBS/HSA waschen
- vorgetestete Menge des Detection-Antikörpers zupipettieren, 1h bei 20°C

inkubieren

- 1 x waschen mit PBS/HSA
- 2µl Streptavidin-PE-CY5.5 zugeben, 30min inkubieren
- Proben mit dem Coulter Epics XL-MCL Durchflusszytometer messen

Tabelle 16: ELIBEAD-Assay mit Kontrollen und Proben

negative Kontrolle	Kultur von 250.000 Beads ohne Testzellen
positive Kontrolle	Kultur von 250.000 Beads ohne Zellen + Standard Substanzen
Probe 1	Kultur von 250.000 Beads mit 20.000 Testzellen
Probe 2	Kultur von 250.000 Beads mit 10.000 Testzellen

Die Daten wurden mit Hilfe der winMDI 2.8 free software ausgewertet. Die negative Kontrolle definiert die Grenze für positive Events in den Testproben. Die positive Kontrolle bestätigt die korrekte Durchführung des Assays.

Berechnung der IFN-γ sezernierenden Zellen:

$$\text{Positive Beads} / 250000 = \frac{\text{Positive Events} \times 250\,000 \text{ Events}}{\text{Totale Events}}$$

Zwölf Beads trennen die Zelle von der nächsten:

$$\text{Anzahl der Zytokin produzierenden Zellen} = \frac{\text{Positive Beads}}{12}$$

4.2.15 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten der Immunmodulationstests wurde der Wilcoxon-Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=5\%$ ($p<0,05$) festgelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Kultivierung von mesenchymalen Stromazellen

Zunächst wurden aus Knochenmarkaspiraten mesenchymale Stromazellen kultiviert, charakterisiert und untersucht, ob eine vom Spenderalter abhängige variable Quantität dieser Zellen existiert. Dann erfolgten Versuche zur Optimierung der Kulturbedingungen für MSC mit dem Ziel einer GMP-konformen Herstellung für einen klinischen Einsatz. Plazentarestblut ist eine alternative Quelle für MSC. Daher sollte anschließend eine praktikable Methode zur Anreicherung von MSC aus PRB gefunden werden. Schließlich wurde geprüft, ob MSC aus Knochenmark und Plazentarestblut identische Eigenschaften besitzen.

5.1.1 Die Quantität von MSC in Knochenmarkaspiraten gesunder Spender

Aus vierzehn Knochenmarkaspiraten gesunder Spender im Alter von 3 bis 48 Jahren wurden MSC-Kulturen etabliert. Eine KM-Probe enthielt zwischen 10 und 135 $\times 10^6$ mononukleäre Zellen. Die Anreicherung der MSC erfolgte mittels CD45- und Glycophorin A-negativ-Depletion (CD45/GlyA-neg.). Aus allen Proben konnten MSC etabliert werden. Aus 1×10^5 vitalen, CD45/GlyA-negativen Zellen wuchsen nach sieben Tagen durchschnittlich 59 (5-166) Spots. Tabelle 17 zeigt die Daten.

Tabelle 17: MSC-Separationen aus KM. Korrelationskoeffizient zwischen Spenderalter und Spotsanzahl $R = -0,44$

Alter Spender in Jahren	MNC Ausgang $\times 10^6$	vitale CD45-negative Zellen $\times 10^6$	Spots pro 10^5 CD45-negative Zellen
3	52	3	87
6	10	1,7	92
9	135	9,7	42
14	18	0,9	35
18	70	4,2	166
23	28	2,75	61
26	52	0,34	68
31	28	2,2	5
31	54	2	119
33	62	1,5	17
41	32	4,6	31
42	54	4,3	62
45	55	5,2	13
48	42	9,2	27

Die Spot-Anzahl war sehr variabel, wobei das Alter der Spender einen Einfluss auf die Anzahl der gebildeten Spots hatte (siehe Abb.1). Statistisch korrelieren die Werte für Alter und Spotanzahl mit einem Korrelationskoeffizienten von $-0,44$ schwach bis mittelstark miteinander.

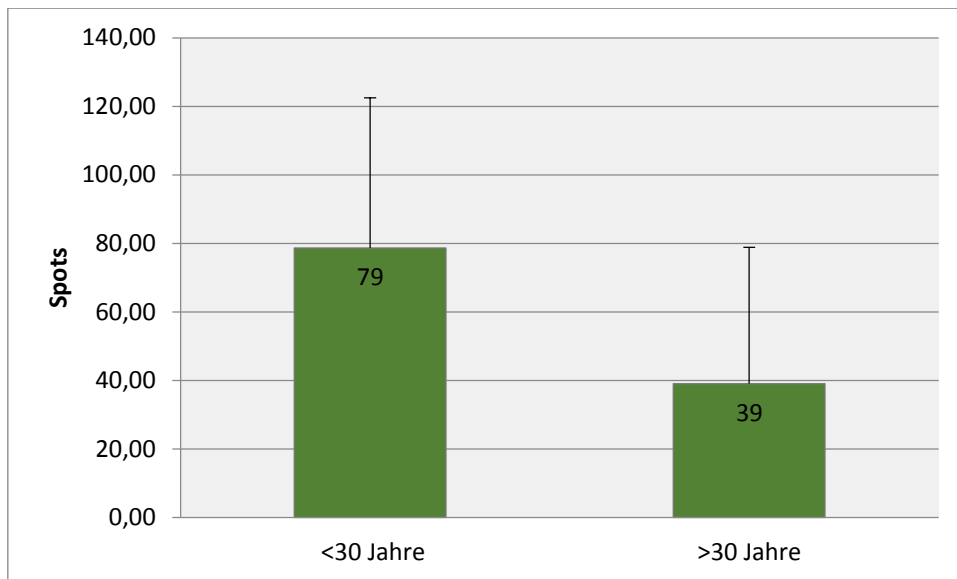


Abbildung 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der gebildeten MSC-Spots pro 10^5 vitaler CD45/GlyA-neg. KM-Zellen in zwei Altersgruppen mit jeweils 7 Spendern

5.1.2 Die Variation der Kulturparameter

Um GMP-konforme Kulturbedingungen zur Etablierung gewünschter Mengen MSC zu erreichen, wurden verschiedene Kulturparameter variiert. Zur Objektivierung der Ergebnisse wurden am Tag sieben die Spots ausgezählt und am Tag vierzehn die erreichte Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Auf statistische Tests wurde aufgrund der kleinen Stichprobenanzahl verzichtet.

5.1.2.1 Kulturgefäßbeschichtung mit ECM-Komponenten

Die Kulturgefäße wurden mit verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix beschichtet. Mit einer Kombination von Kollagen mit Fibronectin wurden am Tag sieben mit 42 durchschnittlich die meisten Spots gezählt. Die höchste Zellausbeute am Tag vierzehn konnte mit der Variante Kollagen mit EDB-Fibronectin erreicht werden (siehe Tabelle 18). Unter Verwendung der Beschichtung mit Kollagen proliferierten durchschnittlich die meisten Zellen aus einem Spot. Für alle folgenden Kulturen wurden die Kulturgefäße mit Kollagen +Fibronectin beschichtet.

Tabelle 18: Variation der Beschichtung der Kulturgefäße mit ECM-Komponenten. Spots am Tag 7 pro 1×10^5 vitaler CD45/GlyA-neg. KM-Zellen; Zellzahl Tag 14; Zellen/Spot. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte und die Streuung der Werte in Klammern. n=5

Beschichtung	Spots Tag 7	ZZ x 10^5 Tag 14	Zellen/Spot
Kollagenschicht	39 (3-110)	0,92 (0,51-1,55)	7632 (1409-17000)
Kollagenschicht mit Fibronectin	42 (0-140)	0,80 (0,20-1,32)	4988 (714-10000)
Kollagenschicht mit Fibronectin/EDB	36 (5-102)	1,04 (0,54-1,60)	7142 (1372-13333)
Fibronectin/EDB	29 (2-66)	0,58 (0,13-1,18)	5138 (541-11250)
Fibronectin	28 (5-67)	0,75 (0,30-1,10)	5387 (1418-10000)

5.1.2.2 Variation des Kulturmediums

Es wurden IMDM und RPMI als Grundlage für die Zellkulturmedien verwendet. In IMDM bildeten sich durchschnittlich mehr Spots und auch die Zellausbeute am Tag vierzehn war größer (Tabelle 19). In RPMI konnten jedoch auch aus wenigen Spots relativ viele Zellen proliferieren, was am Zellen/Spot-Quotienten deutlich wird. Die folgenden Versuche erfolgten unter Verwendung von IMDM im Medium.

Tabelle 19: Variation des Kulturmediums. Spots am Tag 7 pro 1×10^5 vitaler CD45/GlyA-neg. KM-Zellen; Zellzahl am Tag 14; Zellen/Spot. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte und die Streuung der Werte in Klammern. n=5

Kulturmedium	Spots Tag 7	ZZ x 10^5 Tag 14	Zellen/Spot
IMDM	63 (14-131)	3,52 (0,42-9,17)	5330 (4321-8625)
RPMI	28 (3-67)	2,23 (0,44-6,39)	22075 (1294-83000)

5.1.2.3 Variation von Seren

Die besten Ergebnisse hinsichtlich Spotbildung und Zellausbeute am Tag vierzehn ergaben sich für die Kombination 5%PRB +10%AB-Serum, gefolgt von der Variante mit 5%PRB +5%FKS, wie in Tabelle 20 zu sehen. Dabei konnten sich bei 5%PRB +5%FKS mehr Zellen aus einem Spot vermehren. Für alle weiteren Kulturen wurde 5%PRB +5%FKS im Medium verwendet.

Tabelle 20: Variation der Seren und Serumersatzmittel. Spots am Tag 7 pro 1×10^5 vitaler CD45/GlyA-neg. KM-Zellen; Zellzahl am Tag 14; Zellen/Spot. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte und die Streuung der Werte in Klammern. n=4 bzw. 5

Serum/Serumersatz		Spots Tag 7	ZZ x 10^5 Tag 14	Zellen/Spot
20%FKS	(n=5)	18 (4-40)	0,80 (0,08-1,11)	215 (75-567)
5%AB+10%FKS	(n=5)	22 (2-56)	0,51 (0,11-0,94)	174 (32-567)
5%PRB+10%FKS	(n=5)	22 (4-44)	1,54 (0,61-2,22)	317 (123-550)
10%AB	(n=5)	5 (0-16)	0,09 (0,00-0,19)	43 (0-85)
5%AB+5%PRB	(n=5)	11 (0-22)	0,69 (0,34-1,50)	355 (72-1000)
5%PRB	(n=5)	13 (2-32)	0,35 (0,01-1,17)	55 (8-131)
5%FKS+5%PRB	(n=4)	102 (61-175)	4,89 (2,78-8,22)	5841 (1587-9272)
5%PRB+10%AB	(n=4)	141 (78-211)	6,03 (1,94-10,00)	5402 (1556-12857)
5%PRB+10%FFP	(n=4)	53 (14-114)	1,58 (0,83-2,78)	3826 (2439-6000)
20%FFP	(n=4)	19 (8-31)	0,32 (0,06-0,61)	2613 (286-7333)

5.1.2.4 Variation der Wachstumsfaktoren

Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren konnte die Ausbeute an Spots in der Kultur erhöht werden. Die Kombination SCF +EGF +bFGF +PDGF ergab die höchsten Werte für Spots und Zellen am Tag vierzehn. Mit SCF+bFGF+EGF konnten mehr Zellen pro Spot generiert werden, die Zellausbeute blieb aber der mit zusätzlicher PDGF-Gabe unterlegen (siehe Tabelle 21). Alle folgenden Kulturen wurde mit Zugabe von SCF, EGF, bFGF und PDGF durchgeführt.

Tabelle 21: Variation der Wachstumsfaktoren. Spots am Tag 7 pro 1×10^5 vitaler CD45/GlyA-neg. KM-Zellen; Zellzahl am Tag 14; Zellen/Spot. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte und die Streuung der Werte in Klammern. n=4

Wachstumsfaktoren	Spots Tag 7	ZZ x 10^5 Tag 14	Zellen/Spot
SCF+bFGF	65 (14-169)	12,07 (0,14-28,61)	1904 (78-5750)
SCF+bFGF+PDGF	67 (53-100)	15,77 (0,28-31,94)	2028 (53-4652)
SCF+bFGF+EGF	64 (19-178)	15,81 (1,56-38,89)	3121 (509-5286)
SCF+bFGF+EGF+PDGF	93 (50-172)	21,44 (1,06-42,22)	1873 (211-4222)
EGF+PDGF	67 (8-131)	7,93 (0,00-25,28)	1135 (0-2556)
EGF+bFGF	83 (11-189)	10,22 (0,06-26,39)	1079 (35-2833)

5.1.2.5 Zugabe von Serumsupplement

Schließlich wurde untersucht, ob die zusätzliche Gabe eines synthetischen Serumsupplements die Zellausbeute weiter erhöhen kann. Sowohl Spotanzahl, als auch Zellzahl am Tag vierzehn waren in der Kultur ohne Supplement durchschnittlich deutlich höher. Die Werte zeigt Tabelle 22.

Tabelle 22: Zugabe von synthetischem Serumsupplement. Spots am Tag 7 pro 1×10^5 vitaler CD45/GlyA-neg. KM-Zellen; Zellzahl Tag am 14; Zellen/Spot. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte und die Streuung der Werte in Klammern. n=4

Serumsupplement	Spots Tag 7	ZZ x 10^5 Tag 14	Zellen/Spot
mit	54 (19-83)	5,40 (0,69-16,11)	1046 (92-1933)
Ohne	93 (50-172)	21,44 (1,06-42,22)	1873 (211-4222)

5.2 Separationsvarianten zur Anreicherung von MSC aus PRB

Es wurden insgesamt vierzehn PRB-Präparationen mittels fünf verschiedener Methoden mit dem Ziel einer Anreicherung separiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefasst. Es konnten lediglich aus einer PRB-Charge mit CD3-/CD16-/CD45-/GlyA-negativ- Depletion die erreichten homogenen fibroblastären Zellen (siehe Abb. 3) erfolgreich expandiert werden. Aus 5×10^5 eingesäten vitalen Zellen bildeten sich nach neun Tagen 72 Spots und nach 16 Tagen in Kultur konnten 1×10^5 adhärenente Zellen gezählt werden. In der vierten Passage nach 34 Tagen erhöhte sich die Menge bereits auf 2×10^6 Zellen.

Mit Hilfe der CD3-negativ-, sowie CD3-negativ/CD16-negativ-Depletion sowie Sojabohnenagglutinin-Methode konnten zwar ebenfalls fibroblastäre Zellen etabliert werden, jedoch blieb das Gesamtbild der adhärenenten Zellen sehr heterogen. Auffallend bei der Stro-1-Selektion war eine größere Anzahl Fibroblast-ähnlicher Zellen in der Negativfraktion verglichen mit der Positivfraktion. Auch die adhärenenten Zellen in den Kulturen der Stro-1-Negativfraktionen konnten nicht expandiert werden.

Tabelle 23: Fünf verschiedene PRB-Separationen: Morphologie und Expansionsfähigkeit der adhärennten Zellen

Separation	PRB-Charge	Adhärennte Zellen	Expansion möglich
CD3-negativ-Depletion (n=6)	PRB 11, 90, 227, 238, 961218	Fibroblast-ähnliche Zellen vorhanden, insgesamt heterogenes Zellbild	Nein
	PRB 128	keine	
CD3-negativ-Depletion/ Stro-1-positiv-Selektion (n=5)	PRB 11, 90, 128, 227, 961218	Kaum fibroblastäre Zellen, adhärierende Zellen heterogen	Nein
CD3-negativ-Depletion/ CD16-negativ-Depletion (n=2)	PRB 8, 12	Fibroblast-ähnliche Zellen vorhanden, insgesamt heterogenes Zellbild	Nein
CD3-/CD16-/CD45-/GlyA-negativ-Depletion (n=1)	PRB 8	homogenes Zellbild aus fibroblastären Zellen	Ja, 2×10^6 Zellen aus 5×10^5 nach 34 Tagen in Kultur
SBA (n=6)	PRB 94, 95, 99, 104, 147	Fibroblast-ähnliche Zellen vorhanden, insgesamt heterogenes Zellbild	Nein
	PRB 236	keine	

5.3 Der Vergleich der Qualität von MSC aus KM und PRB

Anhand verschiedener Kriterien wurden MSC aus KM und PRB einander vergleichend gegenübergestellt. Tabelle 24 fasst die Ergebnisse zusammen.

Morphologisch ähnelten sich beide Zellkulturen. Die Zellen aus PRB erschienen dabei stärker granuliert als die MSC aus KM (Abb. 2, 3). Eine Gemeinsamkeit besteht in der Adhärenz der Zellen an beschichtete Oberflächen. Hinsichtlich der Zytochemie erwiesen sich sowohl die KM- als auch die PRB-Zellen negativ für CD45,

welches auf allen hämatopoetischen Zellen zu finden ist und ebenfalls negativ für CD117 (SCF-Rezeptor), welcher sich auf hämatopoetischen Vorläuferzellen befindet. Ein positiver Nachweis fand sich in beiden Kulturen für CD105, SSEA-4 und Stro-1 (Abb. 4-7, 9, 10, 12), wobei sich in der PRB-Kultur die Marker SSEA-4 und Stro-1 in späteren Passagen nicht mehr nachweisen ließen (Abb. 11, 13). Im Unterschied zu MSC aus KM konnte CD73 auf den Zellen aus PRB nicht nachgewiesen werden (Abb. 8). Die Knochenmark-MSC ließen sich in neuronale und osteogene Zellen differenzieren (Ergebnisse aus einer parallel durchgeführten Promotionsarbeit). Mit PRB-MSC wurden aufgrund des wenigen Zellmaterials keine Differenzierungstests durchgeführt.

Tabelle 24: Vergleich von Zellen aus KM und PRB.

+ = leicht positiv, ++ = positiv, +++ = stark positiv, - = negativ

		MSC aus KM, 4.Passage	MSC aus PRB, 1./2. Passage
Morphologie		spindelförmig, leicht granuliert	spindelförmig, granuliert
Adhärenz		ja	ja
Phänotyp	CD45	-	-
	CD117	-	-
	CD73	++	-
	CD105	+++	+++
	Stro-1	+	1.Passage + 2.Passage -
	SSEA-4	+	1.Passage + 2.Passage -
Differenzierung	osteogen	ja	nicht durchgeführt
	neurogen	ja	nicht durchgeführt

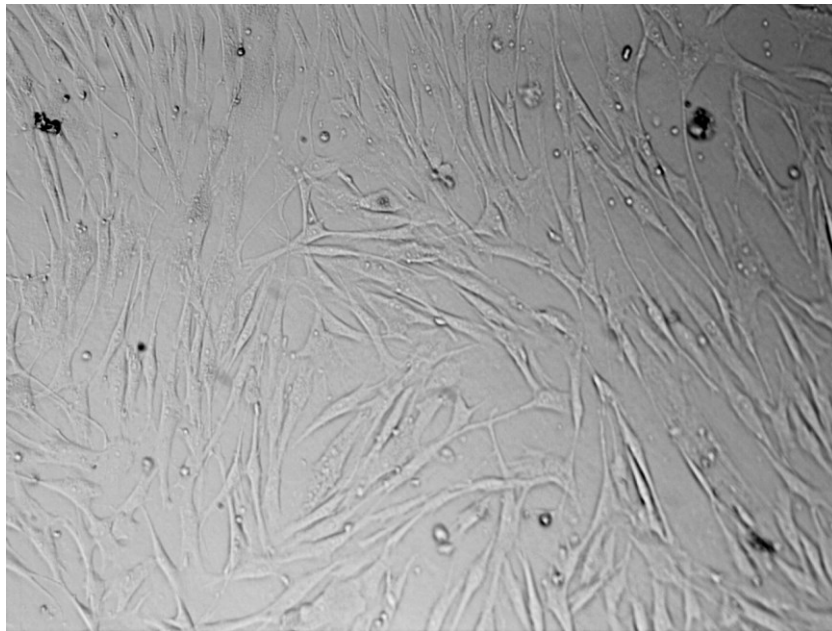


Abbildung 2: MSC aus KM, 4.Passage, Hoffman-Kontrast



Abbildung 3: MSC aus PRB, 1.Passage, Hoffman-Kontrast

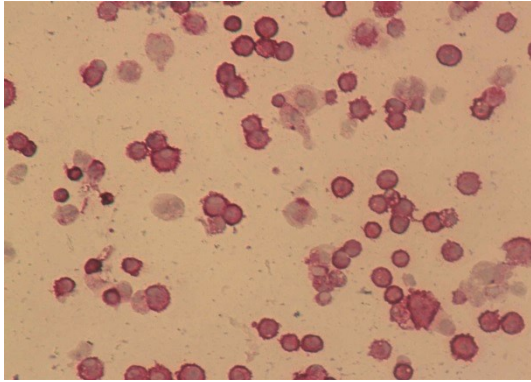


Abbildung 4: MSC aus KM, 4.Passage, CD73 positiv

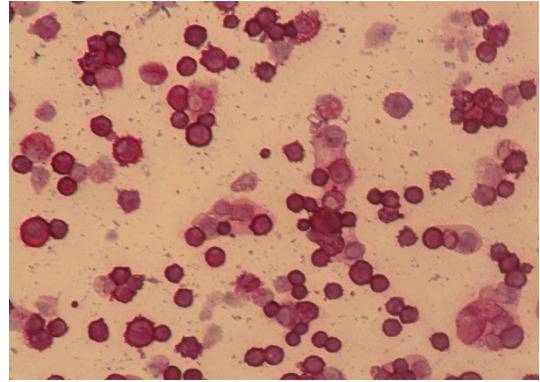


Abbildung 5: MSC aus KM, 4.Passage, CD105 stark positiv

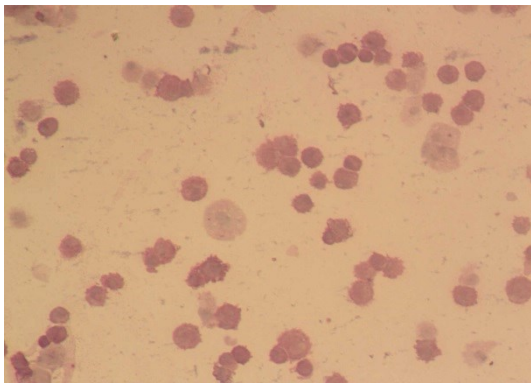


Abbildung 6: MSC aus KM, 4.Passage, Stro-1 leicht positiv

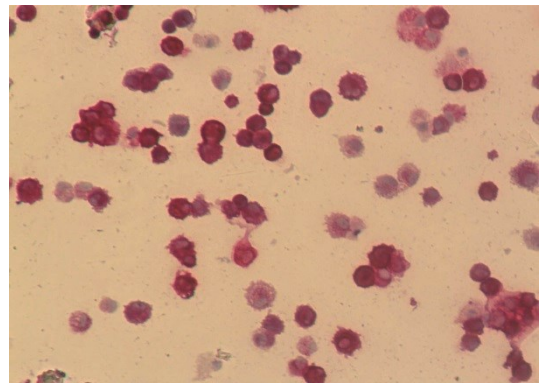


Abbildung 7: MSC aus KM, 4.Passage, SSEA-4 positiv

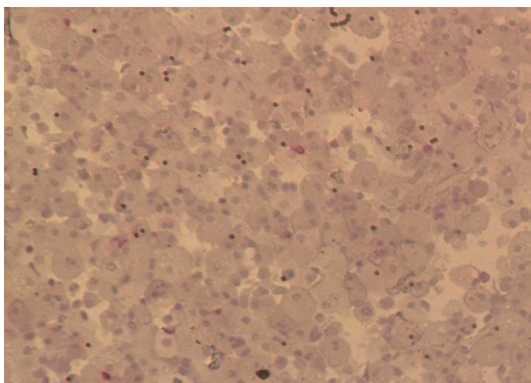


Abbildung 8: MSC aus PRB, 1.Passage, CD73-negativ

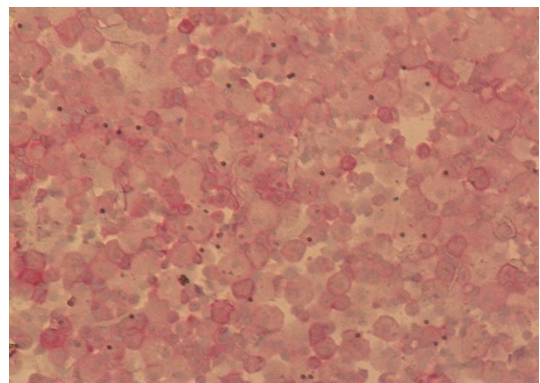


Abbildung 9: MSC aus PRB, 1.Passage, CD105 positiv

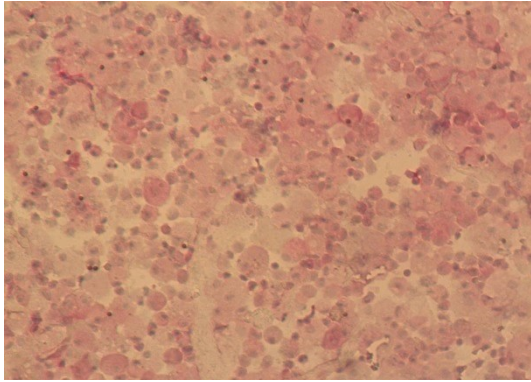


Abbildung 10: MSC aus PRB,
1.Passage, SSEA-4 positiv

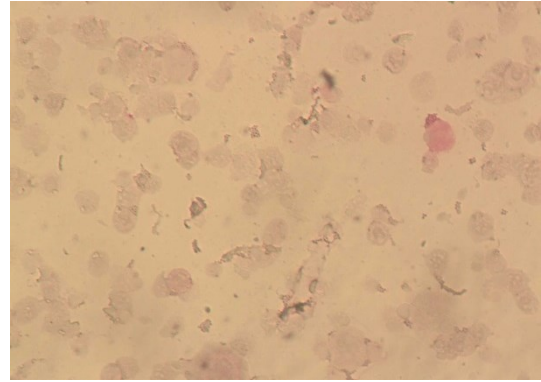


Abbildung 11: MSC aus PRB,
2.Passage, SSEA-4 negativ

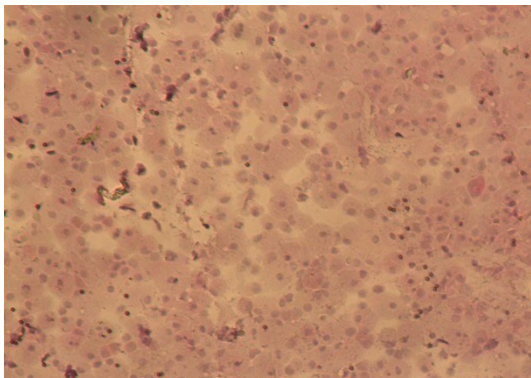


Abbildung 12: MSC aus PRB,
1.Passage, Stro-1 leicht positiv

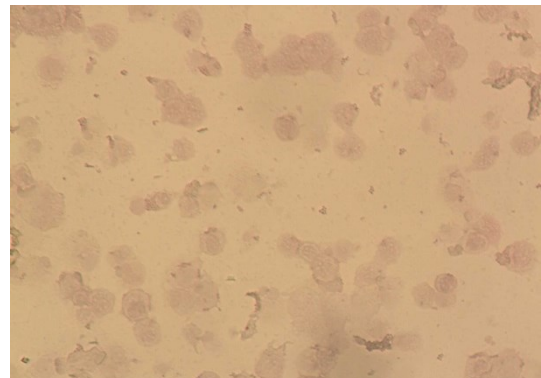


Abbildung 13: MSC aus PRB,
2.Passage, Stro-1 negativ

5.4 Immunmodulatorische Eigenschaften der kultivierten MSC

Als Modell diente die MLR mit deren quantitativer Beurteilung mittels Ermittlung der Zellzahlen, dem BrdU-Einbautest, der Aktivierungsmarker (Durchflusszytometrie) und der Interferonfreisetzung (ELIBEADS-Assay), welche an den Versuchstagen null, fünf und sieben durchgeführt wurden. Es dienten MNC aus Buffy coats sieben verschiedener gesunder Spender als Responderzellen und ein bestrahlter Spenderpool aus jeweils fünf Spendern als Stimulatorzellen. Dabei wurde der

immunomodulatorische Einfluss von MSC eines KM-Spenders und den MSC einer PRB-Spende untersucht.

Es wurde zunächst die Reaktionsfähigkeit der Poolzellen mittels BrdU-Einbautest überprüft. Anschließend wurde getestet, ob MSC einen immunsuppressiven Effekt auf bereits aktivierte MLR haben und ob dies abhängig von der Konzentration der zugegebenen MSC oder der Herkunft aus KM bzw. PRB ist. Schließlich rückte ins Blickfeld der Untersuchung, inwiefern MSC selbst die Responderzellen stimulieren können. Per Wilcoxontest wurden die Ergebnisse auf statistisch signifikante Unterschiede getestet.

5.4.1 Prüfung der Stimulatorzellen der MLR

Die Unterdrückung der Proliferationsfähigkeit der Poolzellen durch die Bestrahlung wurde anhand der Zellzahlen und des BrdU-Einbaus am Tag sieben überprüft. Tabelle 25 zeigt im Vergleich zu den Proben mit autologen Spenderlymphozyten und Spenderlymphozyten +Poolzellen, dass die Poolzellen nicht proliferierten.

Tabelle 25: Zellzahlen und BrdU-Einbautest am Tag 7 mit Spenderlymphozyten autolog, Effektor- und Poolzellen und Poolzellen allein (n=6)

		Spenderlympho- zyten autolog	Spenderlympho- zyten +Poolzellen	Poolzellen
MLR 1	ZZ x10 ⁶ /ml	1,1	2,8	0,8
	BrdU- Einbau	-	1,657	0
MLR 2	ZZ x10 ⁶ /ml	1,3	2,4	0,6
	BrdU- Einbau	-	0,323	0
MLR 3	ZZ x10 ⁶ /ml	0,9	1,8	0,9
	BrdU- Einbau	-	0,789	0,002
MLR 4	ZZ x10 ⁶ /ml	1,5	2,4	0,7
	BrdU- Einbau	-	-	-
MLR 5	ZZ x10 ⁶ /ml	1	2,7	1
	BrdU- Einbau	-	0,474	0,123
MLR 6	ZZ x10 ⁶ /ml	1,4	2,6	1,1
	BrdU- Einbau	-	0,619	0,016

5.4.2 Einfluss unterschiedlicher MSC-Konzentrationen auf die MLR

Es wurden drei MLR mit MNC drei verschiedener Spender und MSC aus einer KM-Quelle durchgeführt. Die MSC-Responder-Verhältnisse betrugen 1:67, 1:100 sowie 1:200 Zellen (5000/10000/15000 Zellen/ml). Anhand des Aktivierungsmarkers CD25 sollte festgestellt werden, ob die MSC eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Aktivierung der Effektorzellen haben. Die Ergebnisse der drei Tests sind in Abb. 14 zu sehen. Die Zugabe unterschiedlicher MSC-Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf die Menge an aktivierten Zellen, die den Aktivierungsmarker CD25 exprimieren. Gleiches galt für die Zellanteile $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ und $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ sowie die Anzahl der IFN- γ -produzierenden Zellen (nicht dargestellt). Aufgrund der kleinen Probenanzahl wurden keine statistischen Tests durchgeführt. Die weiterführenden Versuche wurden mit dem MSC-Responder-Verhältnisse 1:100 fortgesetzt.

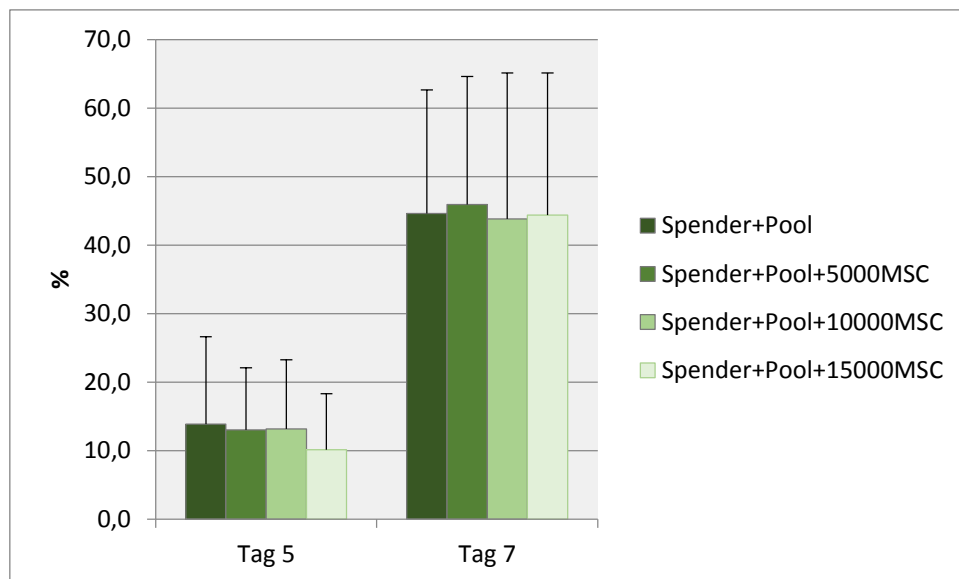


Abbildung 14: Anteil CD25-positiver Zellen in den MLR mit MSC in drei Konzentrationen. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen.

5.4.3 Immunmodulation durch MSC

Durch den Vergleich der Werte der MLR mit Spender- und Poolzellen und der MLR mit Spender-, Poolzellen und MSC wurde die Möglichkeit untersucht, durch Zugabe von MSC auf eine HLA-Aktivierung in der MLR einzuwirken. Gemessen wurden CD25, $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ und der Anteil T-regulatorischer Zellen ($CD4^+CD25^{high}CD127^-$) sowie die Anzahl IFN- γ produzierender Zellen. Die Ergebnisse sind mit Mittelwerten und Standardabweichungen in den Abb. 15 bis 18 dargestellt. Bei der Messung des $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ charakterisierten Zellanteils zeigten sich mit durchschnittlich 7% signifikant höhere Werte in den Proben Spender +Pool +MSC (siehe Abb. 16). Alle weiteren Messungen ergaben keine signifikanten Unterschiede mit oder ohne MSC-Zugabe.

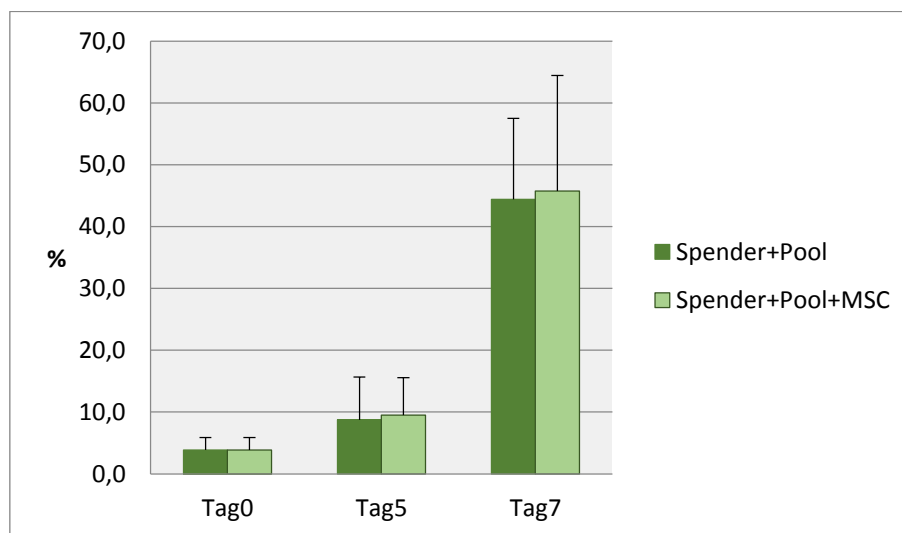


Abbildung 15: Anteil CD25-positiver Zellen in den MLR. Mittelwerte und Standardabweichungen in % aus 15 Versuchen.

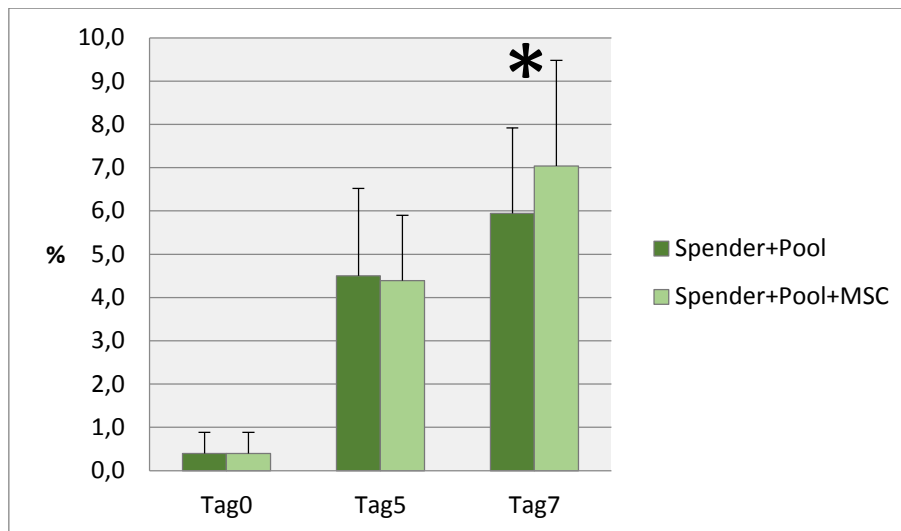


Abbildung 16: Anteil $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ Zellen in den MLR. Mittelwerte und Standardabweichungen in % aus 15 Versuchen. Das mit Stern markierte Wertepaar unterscheidet sich signifikant (Wilcoxon test, $p < 0,05$): Sp+Pool < Sp+Pool+MSC

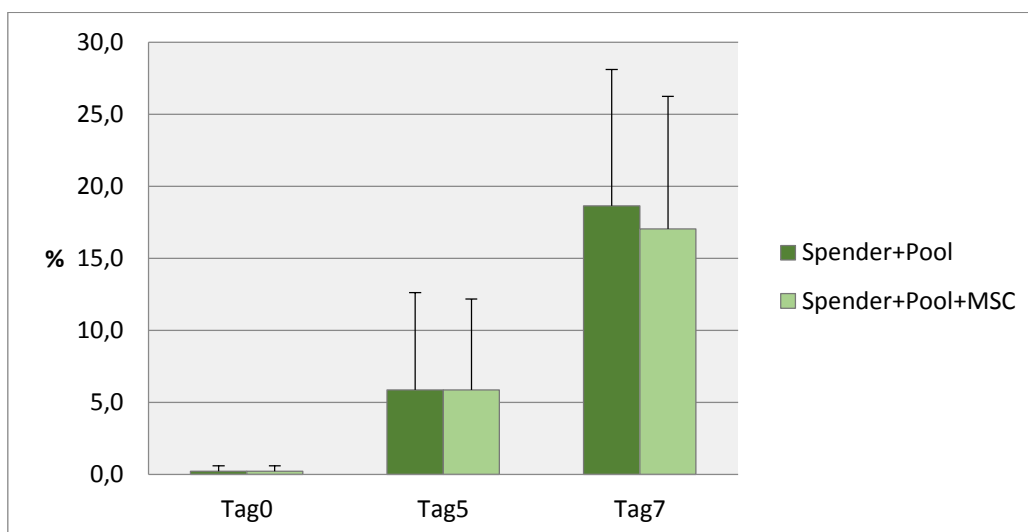


Abbildung 17: Anteil $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ Zellen in den MLR. Mittelwerte und Standardabweichungen in % aus 15 Versuchen.

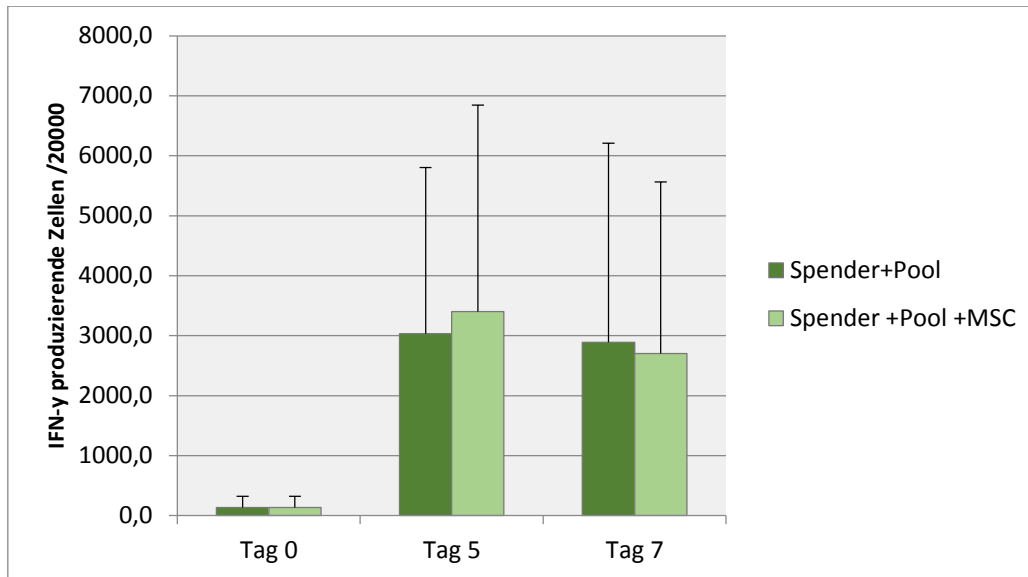


Abbildung 18: Anzahl IFN- γ produzierender Zellen pro 20000 analysierte Zellen aus den MLR. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 15 Versuchen.

5.4.4 Der Einfluss der MSC-Quelle auf die MLR

In drei Experimenten wurde die MLR mit Effektorzellen des jeweils gleichen Spenders sowohl mit MSC aus PRB als auch mit MSC aus KM durchgeführt. Auf statistische Tests wurde aufgrund der geringen Stichprobenzahl verzichtet. Die Abb. 19 und 20 zeigen die Ergebnisse eines Experiments. Nach der Zugabe von PRB-MSC erhöhten sich der Anteil CD25-positiver Zellen, der CD4⁺CD25^{high}CD127⁺ Zellen, sowie IFN- γ -produzierender Zellen in der MLR gegenüber einer Zugabe von MSC aus KM. Der Anteil CD4⁺CD25^{high}CD127⁻ charakterisierter Zellen (Treg) ist in den MLR mit PRB-MSC am Tag sieben ebenfalls höher als nach Zugabe von MSC aus KM.

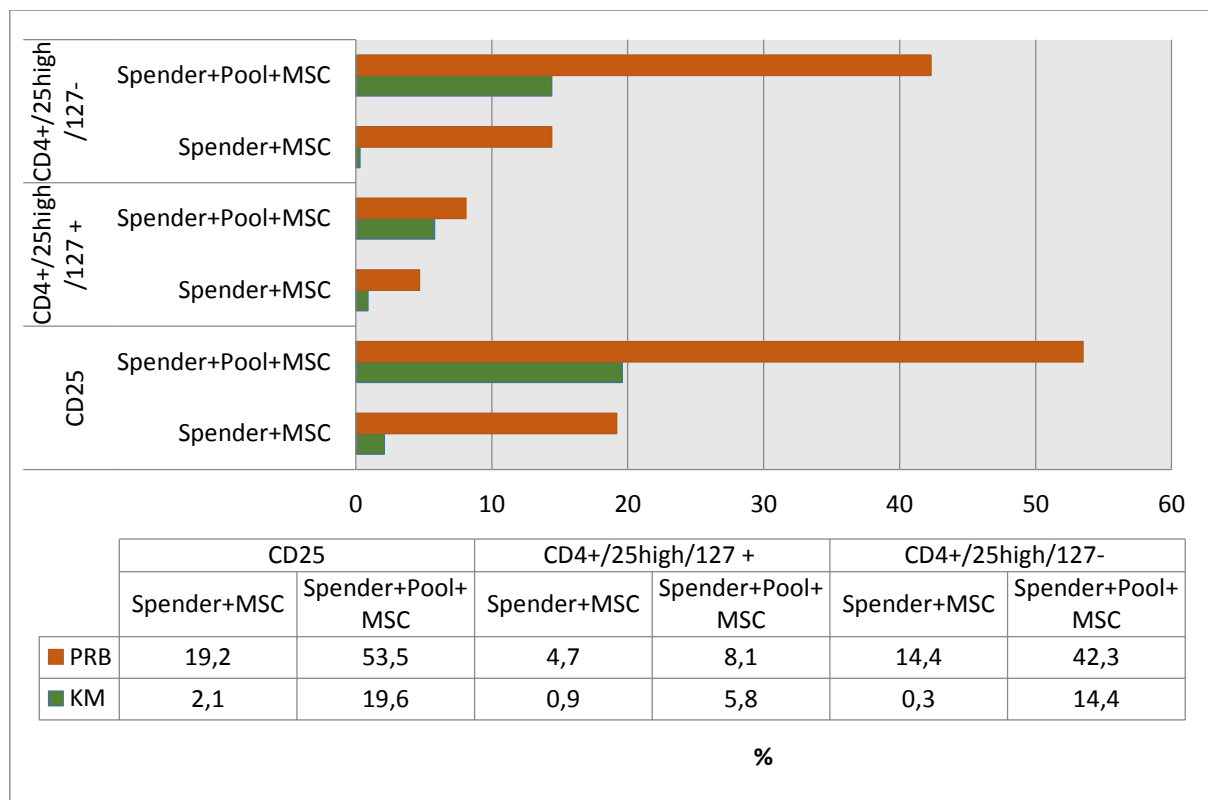


Abbildung 19: Der Einfluss von MSC aus PRB bzw. KM auf die CD25-Expression in der MLR. Werte am Tag 7 in %

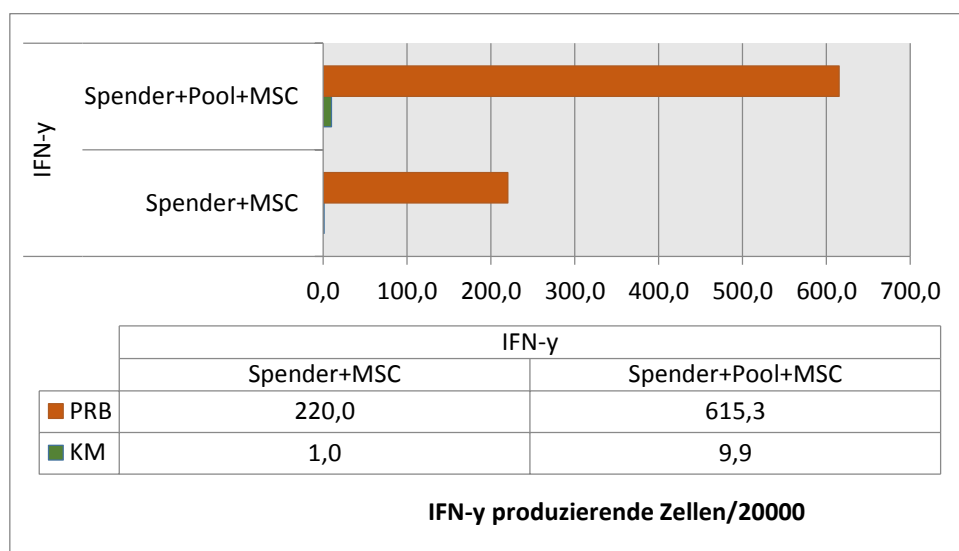


Abbildung 20: Der Einfluss von MSC aus PRB bzw. aus KM auf die IFN- γ produzierenden Zellen von 20000 Zellen am Tag 7

5.4.5 HLA-Reaktivität auf MSC in der MLR

Gegenübergestellt wurden die Werte der MLR mit Spenderlymphozyten ohne Pool und Spenderlymphozyten ohne Pool, aber mit MSC. Die Ergebnisse sind in den Abb. 21-24 zu sehen. Dabei weisen die mit Sternen markierten Wertepaare einen signifikanten Unterschied auf (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$).

Der Anteil CD25-positiver Zellen blieb in den MLR ohne MSC am Tag sieben (Mittelwert 13%) signifikant niedriger als mit MSC (Mittelwert 19%). Der Anteil $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ Zellen war an beiden Tagen signifikant höher in den MLR mit Zugabe von MSC. Die Anteile T-regulatorischer Zellen ($CD4^+CD25^{high}CD127^-$) sind am Tag sieben in den MLR mit MSC signifikant höher als ohne MSC (9% vs. 5%). Zudem fanden sich am Tag sieben mit durchschnittlich etwa 2390 signifikant mehr IFN- γ -produzierende Zellen in der MLR mit MSC als in der MLR ohne MSC (Mittelwert 1260).

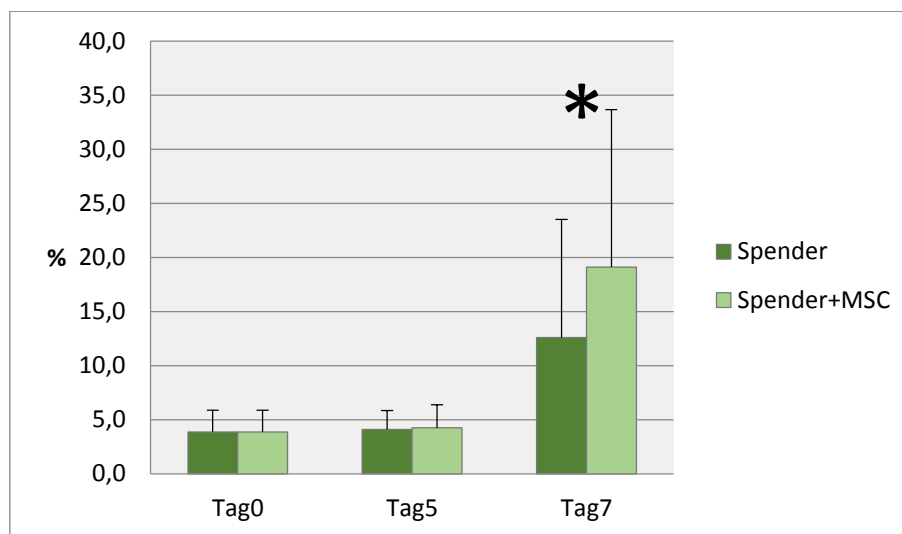


Abbildung 21: Anteil CD25-positiver Effektorzellen nach MSC-Kontakt in der MLR. Mittelwerte und Standardabweichungen in % aus 15 Versuchen. Das mit Stern markierte Wertepaar unterscheidet sich signifikant (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$): Sp+MSC > Sp.

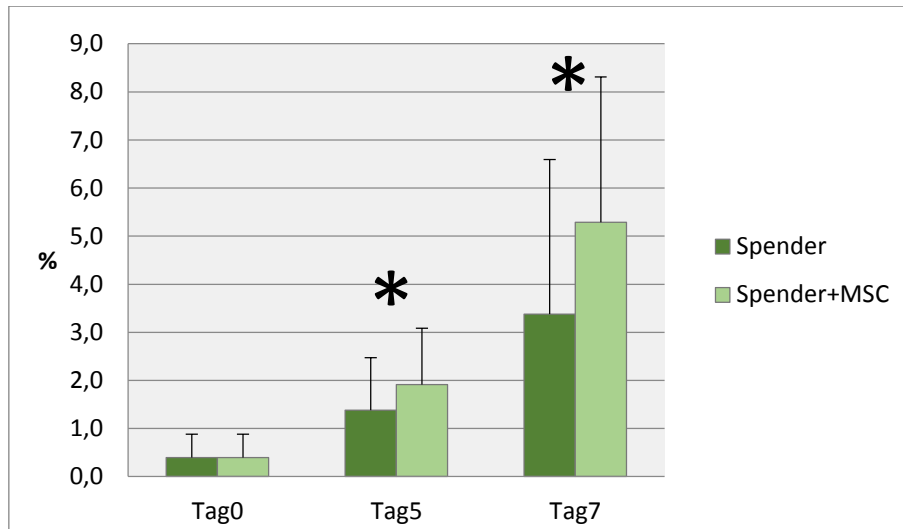


Abbildung 22: Anteil $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ Effektorzellen nach MSC-Kontakt in der MLR. Mittelwerte und Standardabweichungen in % aus 15 Versuchen. Die mit Stern markierten Wertepaare unterscheiden sich signifikant (Wilcoxon-test, $p < 0,05$): Sp+MSC > Sp an den Tagen 5 und 7

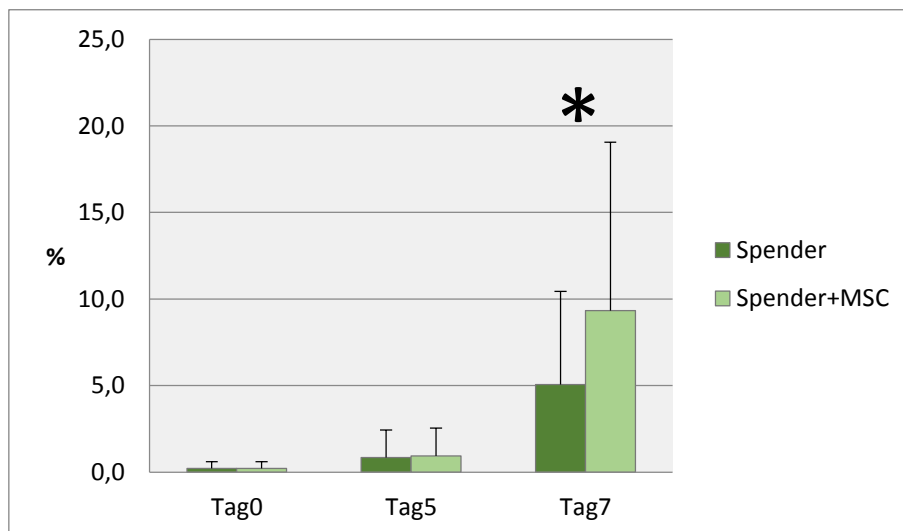


Abbildung 23: Anteil $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ Effektorzellen nach MSC-Kontakt in der MLR. Mittelwerte und Standardabweichungen in % aus 15 Versuchen. Das mit Stern markierte Wertepaar unterscheidet sich signifikant (Wilcoxon-test, $p < 0,05$): Sp+MSC > Sp.

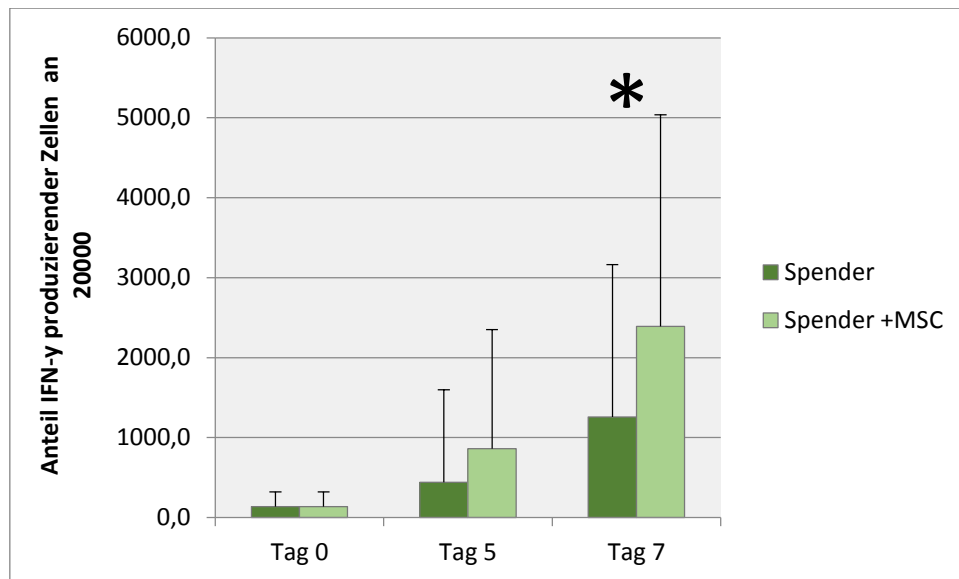


Abbildung 24: Der Einfluss von MSC auf die Anzahl der IFN- γ produzierenden Effektorzellen pro 20.000 analysierte Zellen aus der MLR. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 15 Versuchen. Das mit Stern markierte Wertepaar unterscheidet sich signifikant (Wilcoxon-test, $p < 0,05$): Sp+MSC > Sp.

Abschließend wurde untersucht, ob die Aktivierung der Effektorzellen durch die MSC konzentrationsabhängig ist. MLR mit Zugabe von 5000, 10.000 und 15.000 MSC/ml wurden durchgeführt. Abb. 25 zeigt keine signifikanten Unterschiede der Menge CD25 exprimierender Effektorzellen.

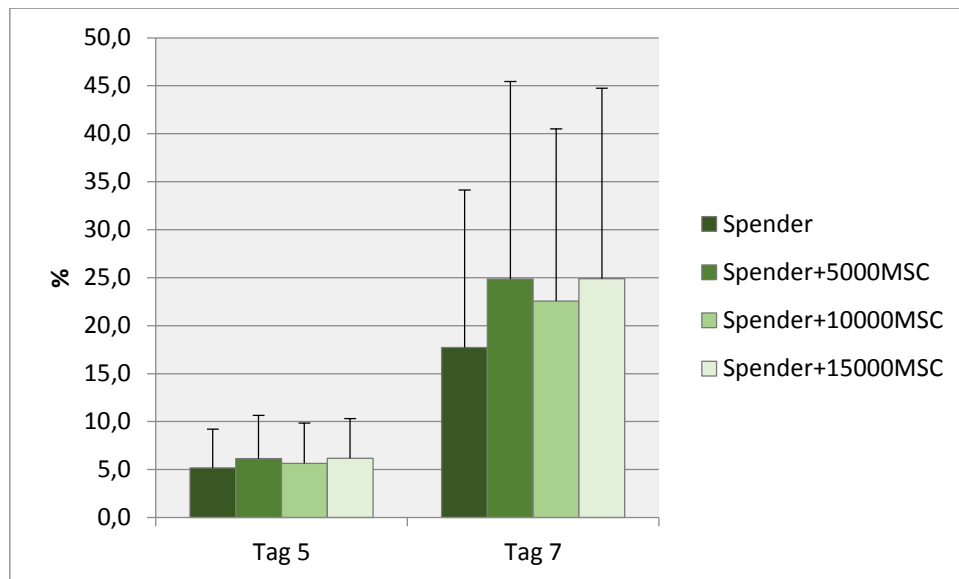


Abbildung 25: Anteil CD25-positiver Zellen in den MLR mit MSC in drei Konzentrationen. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Versuchen.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob mesenchymale Stromazellpräparate unter GMP-gerechten Kulturbedingungen zum erforderlichen Zeitpunkt für einen klinischen Einsatz an Patienten nach HSZT hergestellt werden können. Eine schwere akute GvHD tritt in einem Zeitraum von 21 Tagen bis sechs Wochen nach Transplantation auf. Ein Nichtansprechen auf die Standardtherapie mit Immunsuppressiva und Steroiden ist definiert durch eine Progression nach drei Tagen, unverändertes Fortbestehen der Symptomatik nach sieben Tagen und inkomplettes Ansprechen nach 14 Tagen. Danach kann ein alternativer Therapieversuch in Erwägung gezogen werden. Das Zeitfenster für die Kultur von MSC beträgt demnach maximal 14 Tage bis vier Wochen. In bisher durchgeführten klinischen Studien mit Einsatz von MSC zur Behandlung der GvHD wurden zwischen $0,5$ und 10×10^6 Zellen/kg Körpergewicht als Einzeldosen intravenös infundiert, wobei die Patienten im Mittel etwa $1-2 \times 10^6$ Zellen/kg Körpergewicht und Dosis erhielten. Oft verabreichte man im Verlauf der Behandlung Mehrfachdosen in dieser Größenordnung (Le Blanc et al. 2008, Ball et al. 2013). Das bedeutet, für einen pädiatrischen Patienten mit einem Gewicht von 30kg müssen für vier intravenöse Verabreichungen $0,6-1,2 \times 10^8$ Zellen kultiviert werden. Aus Knochenmarkpunktaten werden die MNC mit enthaltenen MSC üblicherweise per Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Dabei adhären nur 0,01-0,001% dieser Zellfraktion an Plastik und bilden Kolonien (Pittenger et al. 1999). Es wurden in der vorliegenden Arbeit Aspirate von 14 Knochenmarkspendern untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass pro 10^6 MNC nach sieben Tagen Kultur im Mittel nur eine Kolonie MSC nachweisbar war. Tabelle 17 zeigt, dass die Anzahl an Spots sehr variabel und vom Alter der Spender abhängig ist. Dies verdeutlicht zudem die Abb. 1. Von Spendern, die jünger als 30 Jahre waren, konnten im Mittel 79 Spots pro 10^5 eingesäter vitaler CD45/GlyA-negativer KM-Zellen kultiviert werden, während dieser Wert bei Spendern, die älter waren nur bei 39 lag. Dies steht im Einklang mit den Aussagen anderer Autoren (D'Ippolito et al. 1999, Baxter et al. 2004). Zusätzlich geht man davon aus, dass auch die funktionellen Eigenschaften der MSC mit steigendem Spenderalter abnehmen (Stenderup et al. 2003, Sethe et al. 2005). Da für die Herstellung des MSC-Präparates nur drei bis vier wöchentliche Passagen

möglich sind, müssen optimale Kulturbedingungen für die Expansion gefunden werden. Dies kann man durch eine den in vivo Bedingungen angenäherte Beschichtung der Kulturgefäße oder durch eine Optimierung der Kulturmedien und Supplementierung mit Wachstumsfaktoren erreichen.

6.1 Variation der Kulturbedingungen

6.1.1 ECM-beschichtete Kulturgefäße

MSC adhärieren und interagieren durch die Expression von Integrinen an bzw. mit Komponenten der Extrazellulärmatrix, was eine Rolle bei der Steuerung vieler zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung oder auch Apoptose spielt (Docheva et al. 2007). In dieser Arbeit wurden mehrere Beschichtungsmöglichkeiten mit Komponenten der ECM getestet. Die Hauptkomponenten der ECM des Knochenmarks sind Kollagen Typ I, III, IV und Fibronektin sowie Vitronectin. Die Knochenmatrix besteht aus Kollagen Typ I (Docheva et al. 2007, Gronthos et al. 2001). Durch serumhaltige Kulturmedien werden die Kulturflächen mit einer heterogenen Proteinschicht überzogen, die die Adhäsion der Zellen an die synthetische Oberfläche unterstützt. Eine im Serum enthaltene ECM-Komponente ist zum Beispiel Fibronektin (Gronthos et al. 2001). Daher wird bei der Verwendung serumfreier Medien eine Beschichtung der Kulturgefäße mit Komponenten der ECM benötigt (Dänmark et al. 2012). Eine ex-vivo-Expansion von MSC auf artifiziellen Oberflächen führt zur Zellalterung und Verlust des Differenzierungspotentials (Banfi et al. 2002, Baxter et al. 2004). Durch die Verwendung einer den physiologischen Bedingungen ähnlichen Matrix werden diese unerwünschten Effekte möglicherweise verhindert. Die zusätzliche Beschichtung der Kulturgefäße auch bei Nutzung serumhaltiger Medien könnte zudem die Expansion von MSC forcieren. In dieser Arbeit wurden dazu verschiedene Beschichtungsvarianten ausgewählt. Die Hauptbestandteile waren dabei Kollagen I, Fibronektin und Fibronektin mit Extradomäne-B (EDB), eine Isoform von Fibronektin. Diese Isoform ist ein Marker für Angiogenese und findet sich vor allem in fetalem Gewebe sowie Tumorgewebe und auch einigen adulten Geweben wie dem Endometrium oder während des Prozesses der Wundheilung (Castellani et al. 1994). Aus Tabelle 18 wird ersichtlich,

dass die Beschichtungsvariante mit Kollagen mit Fibronectin, beurteilt an der Anzahl der gebildeten Spots an Tag sieben und der Zellmorphologie, gegenüber den restlichen Beschichtungen im Vorteil war. Am Tag sieben etablierten sich im Mittel 42 Spots aus 100.000 CD45/GlyA-negativen Knochenmarkzellen. Durch die Zugabe von EDB-Fibronectin erhöhte sich die Anzahl der Spots nicht, es proliferierten die Zellen aus dem Spot jedoch häufiger, sodass am Tag 14 aus einem Spot bis zu 13.000 Zellen hervorgingen. EDB-Fibronectin ist für eine GMP-gerechte Kultivierung nicht zugelassen und steht zurzeit auch nicht in den benötigten Mengen zur Verfügung, sodass sich die Variante mit Kollagen und Fibronectin als am geeignetsten herausstellte.

Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigten sich ebenfalls mit ECM-Beschichtung der Kulturgefäße für MSC. So verglichen Gronthos et al. die CFU-Bildung von Stro-1-positiven Knochenmarkzellen auf verschiedenen Beschichtungsvarianten. Auf Fibronectin und Kollagen I konnten ähnlich viele CFU-F gezählt werden, wie unter Standardbedingungen mit FKS und auf Plastikoberflächen, wobei Fibronectin und Kollagen I als jeweils eigenständige Varianten untersucht wurden und Fibronectin dabei bessere Ergebnisse erbrachte als Kollagen I (Gronthos et al. 2001). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurden serumfreie Kulturmedien verwendet und zudem frisch isolierte Knochenmarkzellen eingesetzt. Danmark und Mitarbeiter wiesen eine bessere Adhäsion von MSC an Fibronectin und Kollagen I im Vergleich zur Kontrolle mit humanem Serumalbumin in 96-Lochplatten nach. In dieser Arbeit kamen MSC aus einer kommerziellen Gewebekbank zur Verwendung (Dänmark et al 2012). Die Ergebnisse stützen das der vorliegenden Arbeit und sehen ebenfalls Fibronectin und Kollagen als geeigneten Adhäsionsgrund für MSC. Ein direkter Vergleich mit anderen Laborarbeiten bleibt jedoch schwierig, da die Kulturbedingungen nicht einheitlich sind. Sie differieren hinsichtlich der verwendeten Medien und auch der Separationsmethoden für die Anreicherung der MSC und der Tatsache, ob frisch isolierte oder kryokonservierte Zellen verwendet wurden.

Auch weitere Variablen bei der Verwendung von ECM-Komponenten sollten künftig in Betracht gezogen werden. Zum Beispiel beeinflussen die Wahl der ECM-Komponente und auch die Konsistenz der Matrix-Gele die Stammzellqualität (Engler

et al. 2006, Rowlands et al. 2008, Pek et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Qualität der MSC nach Kultur auf den Beschichtungen nicht überprüft.

6.1.2 Variation des Kulturmediums

Es existieren bisher keine allgemeingültigen Empfehlungen zur Kultur der MSC, jedoch sind gängige Kulturbedingungen die Verwendung der Basalmedien α -minimal essential medium (α -MEM), Dulbeccos modified eagles medium (DMEM) oder RPMI unter Zugabe von 10% oder 20% fetalem Kälberserum. Für die GMP-gerechte Kultur sollten jedoch xenogene Mediumbestandteile weitestgehend ersetzt werden, da diese risikobehaftet sind. So geht McDermott davon aus, dass die Zugabe von FKS während der Zellseparation zu einer Reaktion der autologen MLR führt (McDermott und Bragdon, 1983). Selvaggi und auch Mackensen wiesen Antikörper gegen FKS-Albumin in Patienten nach, welche vorher eine Zelltherapie erhalten hatten, wobei die infundierten Zellen in der Gegenwart von 10% bzw. 5% FKS im Nährmedium kultiviert worden waren (Selvaggi et al. 1997, Mackensen et al. 2000). Spees und Mitarbeiter wiesen internalisierte Kälberserumantigene in MSC nach, welche unter Verwendung FKS-haltiger Medien kultiviert worden waren (Spees et al. 2004). Auch bei klinischen Versuchen von Horwitz konnten bei einem Kind mit Osteogenesis imperfecta nach zweimaliger MSC-Infusion FKS-Antikörper nachgewiesen werden (Horwitz et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden zuerst die Medien RPMI und IMDM auf ihre Eignung zur Expansion von MSC untersucht. RPMI ist als zugelassenes Medium für die GMP-gerechte Herstellung von klinischen Zellpräparationen käuflich. Wie in Tabelle 19 anhand der Spot- und Zellzahlen aufgezeigt ist, zeigte sich IMDM gegenüber RPMI als Zellkulturmedium überlegen, darf jedoch bisher bei der Expansion von MSC für den klinischen Einsatz aufgrund der fehlenden Zulassung nicht verwendet werden.

Auch andere Autoren berichten über eine bessere Eignung von IMDM gegenüber RPMI. Bei Barlow et al. führte die Nutzung von IMDM als Basalmedium im Vergleich zum RPMI ebenfalls zu höheren Zellzahlen jedoch nur bei der Kultur von MSC aus

Plazentagewebe und nicht signifikant bei MSC aus Knochenmark (Barlow et al. 2008).

Um xenogene Serumkomponenten aus dem Kulturanatz zu eliminieren, wurden verschiedene Alternativen auf ihre Brauchbarkeit überprüft. Der FKS-Anteil im Kulturmedium wurde auf 5% verringert unter Zugabe von 5% gepooltem humanen Serum aus Nabelschnurblut (PRB-Serum). Wie Tabelle 20 zeigt, wurden die besten Werte mit der Verwendung von 10%AB-Serum mit 5%PRB-Serum erzielt. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen zeigte Kuznetsov in einer Arbeit, dass sich die Zugabe von FKS günstiger auf die MSC-Proliferation auswirkt als Humanserum (Kuznetsov et al. 2000). Bei Shahdadfar führte die Verwendung von allogenen humanen Serum im Vergleich zu autologem sogar zu Zellarest und -tod, wobei autologes Serum sich wiederum besser auf das Zellwachstum auswirkte als FKS (Shahdadfar et al. 2005). Allogenes AB-Serum mit bFGF zeigte bei Yamaguchi und Mitarbeitern keine Nachteile gegenüber FKS-haltiger Nährlösung (Yamaguchi et al. 2002). Zwar konnten mehrere Gruppen auch MSC unter serumfreien Bedingungen kultivieren, zum Beispiel unter Einsatz von thrombozytenreichem Fresh Frozen Plasma (Müller et al. 2006) oder humanem Plättchenlysat (Doucet et al. 2005, Schallmoser et al. 2007, Capelli et al. 2007), jedoch konnte sich bisher aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit keine serumfreie Methode durchsetzen. In den vorliegenden Versuchen zeigte sich die Verwendung von FFP deutlich unterlegen, wie in Tabelle 20 gezeigt wird. Auch die Nutzung eines synthetischen Serumsupplements war nicht erfolgreich (Tabelle 22). Die Verwendung von autologem Serum könnte eine weitere Alternative sein, ist jedoch limitiert durch begrenzte Mengen, die gewonnen werden können. Die insgesamt kontroversen Ergebnisse anderer Gruppen verdeutlichen die Schwierigkeiten, geeignete FKS-freie Kulturbedingungen für MSC zu etablieren, könnten aber auch darauf zurückzuführen sein, dass die verwendeten Humansenen zum Teil nicht inaktiviert wurden.

Weil die Mengen an zur Verfügung stehendem AB-Serum für unsere Experimente begrenzt waren, wurde für die folgenden Untersuchungen weiterhin auf FKS zurückgegriffen, jedoch der Anteil durch Zusatz von 5% humanem PRB-Serum auf 5% verringert. Die höhere Anzahl Spots und von Zellen, die sich aus einem Spot

ergaben, weisen auf einen möglichen Vorteil dieser Variation gegenüber 5%PRB/5%AB-Serum hin (11:102 Spots und 355:5402 Zellen/Spot).

6.1.3 Zusatz von Wachstumsfaktoren

Für die Kultur von MSC unter serumfreien Bedingungen ist die Zugabe exogener Wachstumsfaktoren notwendig (Gronthos und Simmons 1995, Kuznetsov et al. 1997). Zusätzlich sollen die zugesetzten Wachstumsfaktoren die Menge an unreifen MSC erhöhen. Dabei ist bisher unklar, welche Kombination von Faktoren die beste für die Kultur von MSC ist. Als optimale Kombination wurde in dieser Arbeit SCF, EGF, bFGF mit PDGF ermittelt. Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse. Sie erbrachte am Tag 14 die höchsten Werte mit rund 2×10^6 Zellen. Die förderlichen Auswirkungen auf die Proliferation von MSC werden auch von anderen Autoren beschrieben. Gronthos und Simmons sahen mit PDGF und EGF besseres Wachstum, wobei die Zugabe von SCF und bFGF keinen zusätzlichen Effekt erbrachte (Gronthos und Simmons 1995). Mit bFGF-Zusatz konnten Sotiropoulou und auch Battula eine verbesserte Proliferation zeigen (Sotiropoulou et al. 2006, Battula et al. 2007) und auch Kuznetsov erzielte mit der Zugabe von PDGF, EGF und bFGF gutes Zellwachstum (Kuznetsov et al. 1997).

6.2 Anreicherung von MSC aus Plazentarestblut

Wie schon ausführlich dargestellt wurde, ist für die Herstellung eines ausreichenden MSC-Präparates von $> 1 \times 10^8$ Zellen für einen klinischen Einsatz eine große Menge an Knochenmark notwendig. Deshalb werden Alternativen für eine Gewinnung von MSC gesucht, die spenderunabhängig hergestellt und kryokonserviert vorrätig gehalten werden können.

Plazentarestblut könnte eine solche Alternative im Vergleich zum Knochenmark darstellen. Gängige Methode vieler Arbeitsgruppen zur Gewinnung von MSC aus PRB ist die Anreicherung der mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die MNC werden dann mit Einsaatdichten zwischen $0,5-1 \times 10^6$ Zellen/cm² in Plastikkulturgefäßen in Kultur gebracht. Als Kulturmedien wurden RPMI, DMEM, α -MEM oder IMDM mit Zugabe von 10-20% FKS und

eventuell Faktoren wie EGF, bFGF oder VEGF eingesetzt (Flynn et al. 2007). Bei der alleinigen Nutzung von Plastikadhärenz zur MSC-Anreicherung besteht die Gefahr der Verunreinigung der Kultur durch andere, ebenfalls Plastik-adhärenz Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, Lymphozyten oder Endothelzellen (Clark und Keating 1995). Zusätzlich könnten spät adhärenz Subgruppen der MSC durch Entfernung der nicht-adhärenz Zellen verloren gehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Anreicherung von MSC getestet. Es wurden eine Positivselektion mittels des Antikörpers Stro-1, sowie Negativselektionen mit CD3-, CD16-, CD45-, und Glycophorin A- Antikörpern zur Entfernung von hämatopoetischen Zellen - im Speziellen T-Zellen, NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen, sowie Erythrozyten und deren Vorläufern - verwendet. Zudem wurde versucht, mittels Sojabohnenagglutinin unerwünschte Zellen per Agglutination zu entfernen und die Leichtdichtefraktion, in der sich Stammzellen befinden, anzureichern.

Mittels Stro-1-Positiv-/CD3-Negativselektion konnten keine MSC aus der Stro-1-Positivfraktion erhalten werden. Nur in der Stro-1-Negativfraktion zeigten sich adhärenz fibroblastäre Zellen. Möglicherweise liegt dies daran, dass MSC aus PRB noch relativ unreif charakterisiert sind, was an der positiven Ausprägung für SSEA-4 deutlich wird (siehe Abb. 10). Tondreau und Team fanden, gestützt auf die Arbeit von Stewart, in Stro-1 einen Marker für Osteoprogenitoren und postulieren, dass im Vergleich zu diesen Zellen, unreifere Zellen den Marker nicht exprimieren. Zudem verlieren Stro-1-positive Zellen diesen Marker im Verlauf der Ausdifferenzierung (Tondreau et al. 2004, Stewart et al. 1999).

Ebenso erbrachte die Separationsmethode mit Sojabohnenagglutinin nicht den gewünschten Effekt. Sie beruht auf der Bindung der in Sojabohnen enthaltenen Lektine an Lektinrezeptoren verschiedener Zellfraktionen wie T-Zell-Subpopulationen, B-Zellen und Monozyten (Reisner et al. 1980). Diese Zellen agglutinieren und können so leicht von den nicht agglutinierten Zellen entfernt werden. Wahrscheinlich exprimieren MSC im Gegensatz zu pluripotenten

hämatopoetischen Stammzellen ebenfalls diesen Lektinrezeptor und wurden so mit dem Zellkonglomerat verworfen.

Bei allen Separationen mittels Negativselektion von CD3 allein war ein heterogenes Zellbild charakteristisch. Nach wenigen Tagen konnten keine adhärenen Zellen mit MSC-Morphologie mehr beobachtet werden. Wahrscheinlich stören noch in Kultur befindliche Makrophagen/Monozyten das Anwachsen und Proliferieren der MSC. Auch Mareschi und Mitarbeiter fanden nach einigen Passagen nur noch Makrophagen/Monozyten bzw. daraus differenzierte Osteoklasten (Mareschi et al. 2001). Mittels der CD16-Depletion sollten die Kultur störende Makrophagen entfernt werden. Doch auch bei CD3- in Kombination mit CD16-Depletion blieb das Zellbild heterogen und es konnte sich keine Monolayerschicht ausbilden. Vermutlich sind weitere adhärenente Zellen in den Kulturen verblieben und wirken sich negativ auf das Wachstum der MSC aus. Ähnlich wie bei Gutierrez-Rodriguez waren bei den erwähnten Separationen keine Kolonien, sondern lediglich adhärenente fibroblastäre Einzelzellen zu sehen (Gutierrez-Rodriguez et al. 2000), welche jedoch im Laufe der Kulturen verschwanden.

Nur mittels Negativselektion anhand der Oberflächenantigene CD3, CD16, CD45 und Glycophorin A konnten erfolgreich adhärenente Kolonien fibroblastärer Zellen expandiert werden. Wahrscheinlich werden hier die MSC-Kultur störende Makrophagen mittels CD16 und weitere hämatopoetische Zellen in ausreichendem Maße durch die Antikörper eliminiert. Durch Negativselektion konnten Tondreau et al. ebenfalls homogene MSC-Kulturen aus PRB etablieren. Dabei verwendeten sie Antikörper gegen CD45 und Glycophorin A und zudem mittels der RosetteSep-Methode Antikörper gegen CD3, CD14, CD19 und CD38/CD66b zur Abtrennung der hämatopoetischen Zellen von unbehandelten Knochenmarkaspiraten oder von per Dichtegradientenzentrifugation angereicherten MNC. Anhand von CFU-Assays zeigten sie die Überlegenheit der Separationsmethode gegenüber Plastikadhärenz zumindest in der Anfangskultur. Ob jedoch auch Zellmengen in klinisch relevanter Größenordnung nach längerer Zeit in Kultur erreicht werden konnten wird nicht erwähnt (Tondreau et al. 2004).

Es ergibt sich aus den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen eine Quote von einer erfolgreichen MSC-Expansion aus 14 PRB-Spenden (7%). Bei den meisten Autoren ist die Frequenz der erfolgreichen MSC-Präparationen aus PRB ebenfalls gering. Erices et al. wiesen in nur 24% der PRB-Kulturen mit adhätierenden Zellen eine homogene fibroblastäre Morphologie nach (Erices et al. 2000). Wexler und Gutierrez-Rodriguez konnten keine koloniebildenden MSC-ähnlichen Zellen aus Nabelschnurblut gewinnen (Gutierrez-Rodriguez et al. 2000, Wexler et al. 2003). 2004 veröffentlichten Yang und Mitarbeiter eine umfangreiche Arbeit mit Nabelschnurblut und konnten hier nach je drei Wochen Kulturdauer in nur 95 von 411 (23,1%) Plazentarestblutproben MSC etablieren (Yang et al. 2004). Dies deutet darauf hin, dass im Nabelschnurblut wahrscheinlich nur sehr wenige Progenitoren für MSC vorhanden sind. Trotzdem wurden für eine klinische Studie des Jahres 2013 MSC nach diesem Protokoll aus PRB angereichert (Lee et al. 2013).

In der hier durchgeführten Depletion von Zellen, die die Antigene CD3, CD16, CD45 und Glycophorin A tragen, betrug die initiale Einsaatdichte der verbliebenen Zellen im Unterschied zu allen anderen PRB-Separationen nur $2 \times 10^4/\text{cm}^2$. Bei verschiedenen Autoren wird die höchste Wachstumsgeschwindigkeit bei niedrigen MSC-Einsaatdichten angegeben (Colter et al. 2000, Sekiya et al. 2002). Dieser Faktor könnte mit ausschlaggebend für den Erfolg der MSC-Kultur sein.

Goodwin und Kollegen konnten ebenfalls erfolgreich MSC aus PRB kultivieren, sahen Kolonien der Zellen jedoch frühestens nach drei bis vier Wochen in primärer Kultur. Dabei hatten sie ähnlich wie andere Gruppen die MNC separiert und dann in Plastikflaschen in Kultur gebracht (Goodwin et al. 2001). Im Gegensatz dazu zeigen sich in Knochenmarkkulturen MSC bereits nach wenigen Tagen als adhärente Kolonien. Diese verzögerte Koloniebildung kann darauf hinweisen, dass diese Progenitoren besonders unreif sind und damit auch eine besondere Kapazität für eine Expansion besitzen.

Bieback konnte aus Nabelschnurblutspenden in etwa einem Drittel der Fälle MSC etablieren und benennt weitere mögliche Faktoren für die erfolgreiche MSC-Kultur aus PRB. Dazu zählen die zeitnahe Separation der MNC nach Abnahme des Blutes

aus der Umbilikalvene, ein Volumen dieses abgenommenen Blutes von mehr als 33ml sowie eine Ausgangszellzahl über 1×10^8 MNC. Bei den Spenden, die diese Merkmale aufwiesen und zudem keine Zeichen der Hämolyse oder Koagulation erkennen ließen, konnte der Anteil der MSC-Kulturen auf 63% gesteigert werden (Bieback et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit sind die Kriterien Volumen der PRB-Beutel, MNC-Zahl und Zeit zwischen Abnahme der PRB und Weiterverarbeitung nicht dokumentiert, für eine weiterführende Arbeit wäre die Relevanz zu überprüfen. Auch Samuelsson und Kollegen präferieren die Separation aus frischem Ursprungsgewebe. Die Arbeit der Gruppe bezieht sich dabei zwar auf Knochenmark, doch können Parallelen zum PRB gezogen werden (Samuelsson et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit sind kryokonservierte Plazentarestblutspenden verwendet worden, was möglicherweise negative Auswirkung auf die Viabilität der enthaltenen MSC hat. Die meisten der erwähnten Gruppen, verwendeten frisch abgenommene PRB-Spenden.

Ebenfalls zu diskutieren ist die Verwendung allogenen Serums im Kulturmedium. Hier existieren in der Literatur unterschiedliche Meinungen über dessen Gebrauch in der MSC-Kultur. Wie bereits weiter oben erwähnt, führte der Einsatz allogenen Serums bei Shahdadfar und Kollegen zu Zellwachstumsarrest (Shahdadfar et al. 2005), wohingegen dies bei Yamaguchi und Mitarbeitern wiederum keine Nachteile zeigte (Yamaguchi et al. 2002).

Zeddou und Kollegen konnten erfolgreicher MSC aus Nabelschnurgewebe als aus Nabelschnurblut gewinnen (Zeddou et al. 2010). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die aus Plazentarestblut/Nabelschnurblut gewonnenen MSC nicht aus dem Blut selbst, sondern aus dem Gewebe, durch mechanische Beanspruchung bei der Abnahmeprozedur eingebracht werden (Peters et al. 2010). Dagegen spricht eine Arbeit von Roszek, die deutliche Unterschiede zwischen MSC aus Nabelschnurgewebe und Nabelschnurblut aufdeckt (Roszek et al. 2013).

Für einen klinischen Einsatz von MSC aus Plazentarestblut müssen folgende Fragen sicher geklärt werden:

- Sind die Zellen nach einer extensiven Vermehrung aus wenigen Progenitoren noch mit denen aus Knochenmarkaspiraten vergleichbar?
- Ist eine HLA-unabhängige Nutzung, wie von vielen Autoren beschrieben, tatsächlich bedenkenlos möglich?

6.3 Test der Identität von MSC aus KM und PRB

Verglichen wurden die MSC aus der erfolgreichen Anreicherung der PRB-Probe und einer Kultur von MSC aus Knochenmark. MSC aus KM und kultivierte Zellen aus PRB ähnelten sich hinsichtlich ihrer Morphologie, zeigten jedoch auch einige markante Unterschiede in ihrem Phänotyp. Mikroskopisch zu sehen war eine stärker ausgeprägte Granulierung der MSC aus PRB. Im Gegensatz zu Aussagen anderen Autoren (Kern et al. 2006, Jin et al. 2013) war der Oberflächenmarker CD73 bei PRB-MSC nicht nachweisbar. Die Marker Stro-1 sowie SSEA-4 waren schon in der zweiten Passage der PRB-MSC ebenfalls nicht mehr nachweisbar, wohingegen die MSC aus KM bis zur vierten Passage beide Antigene exprimierten. Sowohl die getesteten PRB- als auch MSC aus KM waren negativ hinsichtlich der hämatopoetischen Marker CD45 und CD117 und zeigten Adhärenz zur beschichteten Kulturfläche. Diese Gemeinsamkeiten stehen als MSC-Merkmale im Konsens zur Auffassung von Dominici und Kollegen (Dominici et al. 2006). Aber auch wenn in diesem Konsensartikel der „International Society for Cellular Therapie“ Marker wie CD73, CD90 und CD105 als von allen MSC exprimierte Marker postuliert werden und auch weitere Marker wie Stro-1 lange Zeit als „MSC-typisch“ galten, geht man mittlerweile davon aus, dass bezüglich der Oberflächenantigene das Oberflächenprofil, in Abhängigkeit verschiedener Faktoren, wie unterschiedliche Isolierungsmethoden und Kulturbedingungen, variiert. Außerdem wird vermutet, dass sich der Phänotyp der MSC mit Aktivierungsstatus sowie dem Differenzierungsgrad der Zellen unterscheidet und damit einem dynamischen Wandel unterliegt (Javazon et al. 2004, Majore et al. 2009, Phinney und Sensebé 2013, Anderson et al. 2013).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die entdeckten Unterschiede könnte die Existenz verschiedener Subpopulationen von mesenchymalen Stromazellen sein, wie sie beispielsweise von Colter und Kollegen beschrieben werden. Dabei

erwähnen die Forscher drei verschiedene Zellgruppen anhand der per FACS analysierten Eigenschaften Zellgröße und Granularität, welche sich in Proliferationsverhalten sowie auch Phänotyp unterscheiden (Colter et al. 2000).

Möglicherweise verlieren die MSC aus PRB in Kultur schnell ihre Unreife und differenzieren, was den Verlust der Stammzellmarker SSEA-4 und Stro-1 erklären würde.

Während hier die Differenzierung der MSC aus Knochenmark in neuronale und osteogene Zellen nachgewiesen wurde, wurden aufgrund der geringen Erfolgsquote bei der Kultivierung von MSC aus PRB-Zellen keine Differenzierungstests durchgeführt.

6.4 Immunmodulation durch MSC

Als Modell einer GvHD wurde eine modifizierte MLR eingesetzt. Dabei diente ein bestrahlter Zellpool als Stimulator (Empfänger) und MNC eines gesunden Spenders als Effektor (Transplantat). Die Reaktion der immunkompetenten Zellen des Transplantates auf die körpereigenen Zellen des Empfängers wurden mit der Messung des Aktivierungsmarkers CD25, der Zellpopulationen $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ sowie der regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^{high}CD127^-$) und des Zytokins IFN- γ untersucht.

6.4.1 Prüfung des Modells

6.4.1.1 Test der Stimulatorzellen

Durch die Messung der Zellzahlen und des BrdU-Einbaus konnte ausgeschlossen werden, dass die Poolzellen selbst in der MLR proliferieren und die Ergebnisse so verfälschen. Tabelle 25 verdeutlicht die Aussagekraft des Modells.

6.4.1.2 Einfluss unterschiedlicher MSC-Konzentrationen auf die MLR

Es musste geprüft werden, ob eine immunmodulatorische Wirkung von der Dosis der eingesetzten MSC abhängig ist. Abb. 14 zeigt, dass keine konzentrationsabhängige

Wirkung der MSC festgestellt werden konnte. In der Literatur beschreiben einige Autoren dosisabhängige immunsuppressive Wirkung von MSC (Di Nicola et al. 2002, Rasmusson et al. 2005, Bocelli-Tyndall et al. 2007). Allerdings zeigt sich erst bei hohen MSC-Dosen eine signifikante Suppression. Häufig wird das optimale Zellverhältnis mit 1:10 MSC:Responderzellen angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden die Verhältnisse 1:200, 1:100 und 1:67 verwendet. Di Nicola verwendete sogar Dosen mit 10:1 MSC:Responderzellen (Di Nicola et al. 2002). Auch in der Arbeit von Fang zeigte sich nur bei sehr hohen MSC-Dosen von 1:1 ein antiproliferativer Effekt (Fang et al. 2006). Der Einsatz solch großer MSC-Mengen ist kritisch zu betrachten. Es werden möglicherweise in den MLR der Zellkontakt und damit die Antigenerkennung durch die T-Zellen von diesen hohen MSC-Zugaben erschwert. Die vermeintliche Immunsuppression könnte also auch ein Artefakt sein. Die Autoren untersuchten diese Theorie durch Kontrollen mit autologen T-Zellen oder Fibroblasten in gleichen Konzentrationen und konnten dabei keine supprimierenden Effekte erkennen. Allerdings ist eine Übertragung dieser Bedingungen in die klinische Anwendung kaum möglich. Es müssten den Patienten sehr hohe MSC-Dosen im Bereich 10^{10} für ein 1:1-Verhältnis der MSC zu MNC verabreicht werden, was nicht realisierbar ist. Das MSC-Responderverhältnis 1:100 dagegen entspricht etwa dem Verhältnis der intravenös verabreichten MSC-Mengen in bereits durchgeführten klinischen Versuchen zur Zahl der peripheren mononukleären Zellen im Blut. Daher wurden die weiteren MLR der vorliegenden Arbeit mit diesen Dosen fortgeführt.

6.4.2 Die Modulation der Aktivierung von Effektorzellen durch MSC

Die Funktion von MSC als potente Immunmodulatoren konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Abb. 15 zeigt, dass die Zugabe von MSC zu keiner signifikanten Änderung des Anteils von aktivierten Zellen, gemessenen am Aktivierungsmarker CD25, führte. In Abb. 18 wird deutlich, dass auch die Menge an IFN- γ -sezernierenden Zellen nicht sank, ebenso wie der Anteil T-regulatorischer Zellen mit dem Markerprofil $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ unverändert blieb (Abb. 17). Unter MSC-Zugabe erhöhte sich jedoch die Zellpopulation, die die Oberflächenantigene $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ exprimiert signifikant im Vergleich zu den MLR mit Poolzellen und ohne MSC. Die Funktion dieser Zellen ist bisher nicht näher beschrieben. Im

Zusammenhang mit der chronischen Transplantatabstoßung finden sie Erwähnung (Codarri et al. 2007) und könnten als alloreaktive Population zur Beurteilung der MLR-Aktivierung hinzugezogen werden.

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu anderen in vitro- Arbeiten mit allogenen MSC, welche sich vorrangig mit deren Einfluss auf T-Lymphozyten beschäftigen. Die meisten Autoren bestimmten dabei in ihren Versuchen die T-Zellproliferation mittels [³H]-Thymidin-Einbau, aber in einigen Arbeiten wird auch auf die T-Zell-Subpopulationen und die Zytokinproduktion eingegangen. In der überwiegenden Zahl der Beiträge in der Literatur gehen die Autoren dabei von einem immunsupprimierenden Effekt der MSC unter in vitro-Bedingungen unabhängig von der HLA-Identität aus. Eine Alloaktivierung durch MSC wird nicht beschrieben. Durch grundlegende Unterschiede im jeweiligen Versuchsaufbau wird jedoch die direkte Vergleichbarkeit der Arbeiten erschwert.

Mehrere Autoren zeigen eine verminderte Immunzellproliferation in der MLR unter Zugabe von Knochenmark-MSC (Di Nicola et al. 2002, Tse et al. 2003, Rasmussen et al. 2005, Aggarwal und Pittenger 2005). Mittels ELISpot-Assay konnten Maitra und Mitarbeiter eine Verringerung der IFN- γ -Produktion durch alloreaktive Lymphozyten in der MLR unter Zugabe von MSC feststellen (Maitra et al. 2004). Die Proliferation von CD3⁺CD4⁺- und CD3⁺CD8⁺- Lymphozyten sowie die Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD38 und CD69 verringerten sich bei Versuchen von Le Blanc nach Zugabe von MSC zu durch Phytohämagglutinin stimulierte Lymphozyten (Le Blanc et al. 2004). Auch die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen wird von vielen Autoren als wichtiger Mechanismus der MSC-Immunmodulation gesehen (Macciario et al. 2005, English et al. 2009, Burr et al. 2012). Dies konnte jedoch anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Eine mögliche Erklärung für die teilweise gegensätzlichen Ergebnisse der zusammengefassten in vitro-Experimente im Vergleich zu den vorliegenden ist, dass sich die Versuchsprotokolle in mehreren Parametern unterscheiden. Dazu zählen das Stimulationsagens für die in vitro-Immunreaktion, Verwendung frischer oder kryokonservierter MSC und das eingesetzte Verhältnis der MSC zu den

Responderzellen. In den Vergleichsarbeiten in der Literatur dienten als Aktivatoren allogene Lymphozyten, dendritische Zellen, Mitogene wie Phytohämagglutinin, Porphol-Ester oder mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper beschichtete Beads. Bei der Verwendung von Mitogenen als MLR-Stimulatoren ist fraglich, inwieweit diese MLR als Modell für eine GvHD stehen können, da die pathophysiologische Situation nicht vergleichbar ist, die Mitogenaktivierung als vielfach potenter eingeschätzt werden kann als die Allogenaktivierung. In der Arbeit von Götherström und Kollegen konnten MSC zwar die durch Mitogene stimulierten MLR supprimieren, nicht jedoch die durch Alloantigene stimulierten MLR, was auf unterschiedliche Mechanismen der Aktivierung schließen lässt (Götherström et al. 2004). In der Mehrzahl der erwähnten Arbeiten wurden zudem frische MSC eingesetzt, in der vorliegenden Arbeit jedoch kryokonservierte MSC. Möglicherweise beeinträchtigen der Einfrier- und Auftauvorgang sowie die Dauer der Konservierung die immunmodulatorischen Fähigkeiten der MSC. Pittenger und Agarwal verwendeten jedoch ebenfalls kryokonservierte MSC ohne Funktionseinbußen (Agarwal und Pittenger 2005). Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit werden in der erwähnten Vergleichsliteratur meist höhere MSC-Dosen eingesetzt, was die Vergleichbarkeit ebenfalls erschwert. Das in dieser Arbeit gewählte Modell der MLR mit einer Zugabe von MSC am Tag null ist möglicherweise nicht adäquat, weil die Aktivierung der Effektorzellen erst nach dem Tag vier zu erkennen ist. Eventuell gibt es eine Parallele zu der Modifizierung der MLR mit SCF und IL-2. Bei einer Zugabe von IL-2 von Tag null an konnte ebenfalls keine Aktivierung der Effektorzellen durch Poolzellen festgestellt werden, die jedoch bei der Zugabe am Tag vier sehr deutlich messbar war (Schrey 2006). Eine Abhängigkeit der MSC-Wirkung vom Zeitpunkt der Applikation wird auch von Polchert et al. vermutet. Möglicherweise können MSC erst in einer inflammatorischen Umgebung ihr immunsuppressives Potential entwickeln, werden in diesem Milieu „aktiviert“ (Polchert et al. 2008).

6.4.3 Der Einfluss der MSC-Quelle auf die Immunmodulation durch MSC

Wie auch schon bei der Prüfung der Eigenschaften von MSC aus PRB und KM zu sehen war, ist keine vollständige Identität beider nachweisbar. Die Verwendung von MSC aus PRB scheint im Vergleich zu MSC aus KM in der MLR eine verstärkte

Aktivierung der Spenderlymphozyten zu bewirken. Dies war sowohl in den bereits aktivierten MLR mit Pool-Zellen als auch den autologen Proben mit MSC-Zugabe im in den Abb. 19 und 20 gezeigten Beispiel ersichtlich. Die CD25-positiven Zellanteile sind deutlich höher, allerdings auch die Anteile der T-regulatorischen Zellen ($CD4^+CD25^{high}CD127^-$). Dabei war jedoch bei dem kleinen Stichprobenumfang keine statistische Signifikanz nachzuweisen. Für MSC aus PRB existieren in der Literatur nur wenige Arbeiten, welche sich mit deren immunmodulatorischen Eigenschaften und weiterführend einer klinischen Anwendung in Bezug auf die GvHD beschäftigen. Tisato und Kollegen konnten in vitro die Unterdrückung der T-Zellproliferation durch MSC aus Nabelschnurblut nachweisen. Dabei wurden die T-Zellen mittels anti-CD3/CD28-Beads stimuliert, ähnlich zur Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen. In verschiedenen Konzentrationen wurden MSC zugegeben von 1:5 bis 1:500 MSC:Responderzell-Ratio. Signifikant niedriger war die T-Zell-Proliferation nur bei den hohen Verhältnissen 1:5 und 1:10, nicht jedoch bei Verhältnissen ähnlich denen der vorliegenden Arbeit. Im Mausmodell zeigte sich keine Wirkung der gegebenen MSC auf eine bereits entwickelte GvHD. Nur nach Mehrfachgaben zur Prävention der akuten GvHD schienen die MSC aus Nabelschurblut wirksam (Tisato et al. 2007). Lee et al. cotransplantierten allogene MSC aus Nabelschnurblut zur HSZT bei sieben Kindern mit akuter Leukämie und untersuchten dabei im Vergleich zu einer Kontrollgruppe das Engraftment der HSZ-Transplantate aus Nabelschnurblut, sowie das Auftreten transplantationsassoziiierter Nebenwirkungen, wie der akuten GvHD. Bezüglich der GvHD zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne MSC-Gabe. Im Vorfeld der klinischen Versuche wurde die Immunogenität der MSC in der MLR getestet. Die Autoren berichteten nach MSC-Zugabe nur niedrige IFN- γ -Werte im Vergleich zu PHA-stimulierten Proben, wobei die Ergebnisse nicht explizit dargestellt wurden (Lee et al. 2013). Es fehlt zudem der Bezug zu autologen Proben. Dadurch ist der Vergleich mit der vorliegenden Arbeit erschwert. Eine Gegenüberstellung der immunmodulierenden Fähigkeiten von MSC aus KM, PRB und Fettgewebe wurde durch Jin und Kollegen angestellt. Es wurden LPS-aktivierte Alveolarmakrophagen von Ratten mit MSC kokultiviert und das Zytokinexpressionsmuster ermittelt. Verglichen mit MSC anderer Herkunft konnten die MSC aus Nabelschnurblut das antiinflammatorische Potential ebenfalls

entwickeln (Jin et al. 2013). Der Versuchsaufbau unterscheidet sich jedoch elementar von dem GvHD-Modell der hier vorliegenden Arbeit, wodurch eine direkte Vergleichbarkeit auch hier nicht gegeben ist. Zusammenfassend belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und auch die wenigen Vergleichsarbeiten eine immunsuppressive Wirkung von MSC aus Nabelschnurblut/Plazentarestblut nicht. Allerdings bleibt zu bedenken, dass aufgrund der nicht durchgeführten Differenzierungstests für die PRB-MSC dieser Arbeit keine Aussage über den Differenzierungsstatus der eingesetzten Zellen gemacht werden kann. Es wird vermutet, dass dieser eine Rolle bezüglich der Immunogenität der MSC spielt, wobei kontrovers diskutiert wird, ob differenzierte oder nicht differenzierte Zellen stärker immunsuppressiv vs. immunogen wirken (Griffin et al. 2013, Le Blanc et al. 2003).

6.4.4 HLA-Reaktivität auf MSC

Der Vorteil der Verwendung allogener HLA-nichtidentischer MSC liegt in der Möglichkeit, Zellen zu jedem gewünschten Zeitpunkt in genügender Menge als Kryopräparat zur Verfügung stehen zu haben.

Viele Autoren vermuten anhand der fehlenden Expression von MHC-I-Antigenen und geringer MHC-II-Expression sowie dem fehlenden Nachweis von Fas-Ligand (CD95-Ligand) und costimulatorischen Molekülen der B7- Gruppe (CD80, CD86), dass MSC nicht von einem fremden Immunsystem erkannt werden (Tse et al. 2003, Le Blanc et al. 2003, Ryan et al. 2005). Sie fanden keine Aktivierung der Effektorzellen in der MLR durch MSC (Tse et al. 2003, Maitra et al. 2004, Beyth et al. 2005, Bocelli-Tyndall et al. 2007). Diese Erkenntnisse stehen im Kontrast zu den vorliegenden Testergebnissen. Die Cokultivierung von MSC mit Effektorzellen führte zu einem signifikanten Anstieg von CD25-positiven Zellen am Tag sieben im Vergleich zu den autologen Kontrollen (Abb. 21), einem signifikant erhöhten prozentualen Anteil an CD4⁺CD25^{high}CD127⁺ positiven Zellen an den Tagen fünf und sieben und von regulatorischen T-Zellen am Tag sieben (Abb.22 und 23). Auch die Anzahl IFN- γ -produzierender Zellen erhöhte sich signifikant am Tag sieben (Abb.24).

Erst bei Erkennung eines spezifischen Antigens wird die Synthese von CD25, der alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors, auf den T-Zellen induziert, welcher dadurch eine hohe Affinität für IL-2 entwickelt. Die Bindung von IL-2 an den hoch affinen Rezeptor bewirkt die Proliferation der T-Zellen. Zur IFN- γ -Ausschüttung kommt es durch die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und proinflammatorischer T_H1-Zellen. Die Hauptaufgabe des IFN- γ besteht in der Makrophagenaktivierung. Zudem werden MHC-I- und II-Moleküle zur besseren Antigenerkennung auf den Zellen hochreguliert (Murphy et al. 2009).

Zahlreiche Hinweise in der Literatur stellen die vermeintliche Sonderposition der MSC in Frage und bestätigen damit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Le Blanc et al. wiesen intrazellulär hohe Konzentrationen von HLA-II-Molekülen nach und sahen zudem, dass nach IFN- γ -Stimulation die HLA-II-Expression auf der Zelloberfläche zunahm, wobei diese MSC dennoch keine Stimulation der MLR bewirkten. Auch Potian und Kollegen konnten auf MSC ebenfalls eine HLA-II-Expression nachweisen. Im Gegensatz zu Le Blancs Arbeit kam es jedoch zur Aktivierung der MLR mit MSC als Stimulatoren. Allerdings unterdrückten zugegebene MSC die Proliferation einer Allogen-aktivierten MLR, wohingegen mit Antigenen wie Tetanustoxoid und *Candida albicans* wiederholt stimulierte Lymphozyten durch die MSC-Zugabe sogar noch stärker proliferierten. Die Autoren interpretierten dies als Veto-Funktion der MSC (Potian et al. 2003). Die HLA-II-Expression ist möglicherweise abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen (Le Blanc et al. 2003, Tse et al. 2003, Potian et al. 2003) und könnte auf eine antigenpräsentierende Funktion mesenchymaler Stromazellen hindeuten. Auch Chan et al. sehen eine antigenpräsentierende Funktion von MSC unter dem Einfluss von IFN- γ . Nach hoch dosierter IFN- γ -Vorbehandlung der MSC konnten vermehrt HLA-I- und auch -II-Moleküle auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Es zeigten sich eine vermehrte T-Zellproliferation und erhöhte CD25-Werte in der MLR mit MSC als Stimulatoren (Chan et al. 2008). Die MSC aktivieren T-Lymphozyten also womöglich als Alloantigene über HLA-I-Moleküle und/oder über ihre antigenpräsentierenden Fähigkeiten, vermittelt durch HLA-II-Moleküle. Le Blanc konnte in einigen Proben eine HLA- und dosisunabhängige Proliferation der Lymphozyten nachweisen, wenn MSC allein zur Lymphozytenkultur gegeben wurden (Le Blanc et al. 2003). In der hier

vorliegenden Arbeit war die Aktivierung durch MSC ebenfalls nicht dosisabhängig (siehe Abb. 25). Eine mögliche HLA-Unabhängigkeit der Aktivierung wurde nicht untersucht. Außerdem wird bei Le Blanc eine zusätzliche Aktivierung der durch gepoolte Spenderlymphozyten bereits aktivierten MLR bei Zugabe von niedrigen MSC-Dosen im Bereich MSC:Responder kleiner 1:10 bis 1:10000 beschrieben (Le Blanc et al. 2003). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nur anhand der Ausprägung der Zelloberflächenmarkerkombination $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ vermutet werden. Eine Zugabe von MSC in niedrigen Dosierungen führte auch bei Fang und Kollegen zur T-Zellaktivierung. Mittels Ki-67-Antigenfärbung stellten sie die Proliferation in MLR mit Zugabe von MSC als Stimulatorzellen dar und stellten fest, dass in allen Proben mit allogenen MSC in niedrigeren Konzentrationen (<1:5 bis 1:100) die T-Zell-Proliferation, sowie auch die IL-2- und IFN- γ -Produktion höher ausfielen als ohne MSC. Dies erklären die Autoren mit einer Balance der allostimulatorischen und immunsuppressiven Fähigkeiten der MSC. Erst mit höheren Zelldosen können MSC eine Immunsuppression bewirken, daher überwiege bei niedrigeren Dosen die Allostimulation (Fang et al. 2006). Fraglich bleibt, wie bereits weiter oben diskutiert, die klinische Relevanz solch hoher MSC-Dosen. Klyushnenkova zeigte in ihren Experimenten ebenfalls eine T-Zell-Aktivierung durch MSC, welche sich wie in der vorliegenden Arbeit in einer erhöhten IFN- γ -Produktion ausdrückte, wohingegen eine vermehrte T-Zellproliferation nicht nachgewiesen werden konnte. Außerdem bildeten selektierte T-Zellen ein Gedächtnis auf allogene MSC aus. Die Immunzellen reagierten zwar nicht direkt oder weniger stark auf MSC, erkannten diese jedoch und wurden bei „Wiedersehen“ des Alloantigens ähnlich stark aktiviert wie durch MNC geprimte T-Lymphozyten (Klyushnenkova et al. 2005). Wenn das Immunsystem allogene MSC erkennt und ein immunologisches Gedächtnis bildet, könnte dies zu unerwünschten Reaktionen im Falle einer wiederholten MSC-Gabe oder auch bei der zukünftigen Gabe von anderen Zellprodukten wie beispielsweise Blutprodukten oder bei eventuellen Organtransplantationen führen.

Aufgrund der hohen Mortalität der schweren akuten GvHD besteht ein besonderes Interesse an der Verwendung neuer Therapieansätze wie der mesenchymalen Stromazellen zur Immunmodulation. Daher gibt es bereits zahlreiche klinische

Versuche mit MSC am Menschen. Auf die erste Fallstudie von Le Blanc mit der Infusion allogener MSC zur Behandlung eines Patienten mit steroidresistenter GvHD (Le Blanc et al. 2004) folgten weitere Studien mit wenigen Patienten und eine Multicenter-Phase-II-Studie, welche vielversprechende Ergebnisse lieferten (Ringden et al. 2006, Fang et al. 2006, Le Blanc et al. 2008). In der Multicenter-Studie von Le Blanc und Kollegen wurden 55 Patienten mit steroidresistenter GvHD mit ein- oder mehrfacher MSC-Gabe von HLA-identischen Spendern sowie Geschwisterspendern und auch allogenen MSC behandelt. Es sprachen etwas mehr als die Hälfte der untersuchten Patienten auf die MSC-Gabe an. Dabei wurden keine Nebenwirkungen und eine niedrigere transplantationsassoziierte Mortalitätsrate bei Komplettrespondern im Vergleich zu Patienten mit partiellem Ansprechen und nicht-Ansprechen unabhängig von den HLA-Eigenschaften berichtet (Le Blanc et al. 2008). Die Patienten mit nur partiellem oder keinem Ansprechen auf die Therapie erhielten zusätzliche Infusionen, was die Responserate erhöhen konnte. Dies spricht für eine mögliche Elimination der MSC im allogenen Setting, allerdings war die Ansprechrage nicht HLA-match-abhängig. Eventuell werden MSC auch im Umfeld der ausgeprägten Inflammation bei GvHD unwirksam. Eine doppelblinde, placebokontrollierte Phase-III-Studie unter Verwendung von „Prochymal®“, serienmäßig produzierter allogener MSC, zur Behandlung von 244 Patienten mit akuter GvHD konnte die daraufhin gehegten Erwartungen jedoch nicht erfüllen. Im Vergleich zur Placebogruppe zeigte sich kein Vorteil bezüglich des Gesamtansprechens in der Gruppe der steroid-refraktären Patienten und ebenfalls nicht in der Gruppe der Patienten mit de novo GvHD. Die Patienten erhielten dabei acht MSC-Infusionen mit 2×10^6 Zellen/kg Körpergewicht pro Dosis über einen Zeitraum von vier Wochen (Martin et al. 2010). Diese Ergebnisse, ohne den Nachweis einer klinischen Immunmodulation durch MSC, stehen im Einklang mit den Aussagen der vorliegenden Arbeit.

Die insgesamt kontroversen Erkenntnisse in vitro und in klinischen Versuchen erschweren eindeutige Aussagen zu den Immuneigenschaften der MSC. Verschiedene Gründe könnten dafür verantwortlich sein. Neuere Studien vermuten eine Förderung der T-Zell-Subentität Th17 durch MSC, was die schlechte Wirksamkeit der MSC bezüglich der GvHD-Behandlung erklären könnte, da dieser T-

Zell-Subtyp nach neuesten Erkenntnissen eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie spielt (Teshima 2011, Kim et al. 2013). Auch die möglicherweise notwendige Aktivierung der MSC ist wichtig für den richtigen MSC-Applikationszeitpunkt und damit für den Erfolg in der klinischen Anwendung. In der vorliegenden Arbeit wurden die MSC nicht zuvor „aktiviert“ oder zu einem zu frühen Zeitpunkt zugegeben, was möglicherweise Gründe für die fehlende Immunmodulation sein könnten. Dem Zytokin IFN- γ wird dabei eine entscheidende Rolle zugeschrieben, ohne dessen Einwirkung sich nur geringe oder keine immunmodulatorischen Effekte zeigen (Krampera et al. 2006, Polchert et al. 2008). Gleichzeitig können MSC jedoch über den Einfluss durch IFN- γ das Immunsystem durch Antigen-präsentierende Fähigkeiten aktivieren (Stagg et al. 2006, Cho et al. 2008) und werden abgestoßen (Rafei et al. 2009). Ob es zur Supprimierung oder Aktivierung des Immunsystems kommt, hängt möglicherweise von der Höhe der Konzentrationen von IFN- γ ab (Chan et al. 2008). Eine andere Erklärung für die kontrovers beschriebenen Wirkungen von IFN- γ ist die von einigen Autoren postulierte mögliche Existenz von unterschiedlichen Subpopulationen von MSC mit pro- oder antiinflammatorischen Funktionen (Waterman et al. 2010, Romieu-Mourez et al. 2009, Burr et al. 2012). Somit könnte es sich bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten MSC um proinflammatorische MSC handeln. Zu vermuten ist auch, dass die funktionellen Eigenschaften der Zellen stark spenderabhängig sind. Ähnlich sieht dies Galipeau, der ein gutes oder schlechteres Ansprechen von MSC auf IFN- γ als abhängig vom Spender beschreibt. Da in der vorliegenden Arbeit nur MSC eines KM-Spenders bzw. MSC einer PRB-Spende für die Versuche zur Immunmodulation zur Verwendung kamen, konnte die Spenderabhängigkeit nicht näher untersucht werden. Als weiteren Faktor, welcher die Qualität von MSC hinsichtlich ihrer immunmodulierenden Fähigkeiten beeinflussen könnte, nennt der Autor die Kryokonservierung, durch welche auch die MSC in den vorliegenden Versuchen beeinträchtigt worden sein könnten (Galipeau 2013).

7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Um die Verwendung von MSC am Patienten sicher zu gestalten, sollten xenogene Mediumbestandteile ersetzt werden. Mit dem Einsatz von 10% inaktiviertem AB-Serum und 5% PRB-Serum und der Zugabe der Wachstumsfaktoren SCF, bFGF, EGF und PDGF ist dies bei Erhaltung der Expansionsfähigkeit der MSC möglich. Das AB-Serum muss, wie üblicherweise das FKS, vorgetestet und eine geeignete Charge ausgewählt werden. Die Beschichtung der Kulturflächen mit Kollagen und Fibronectin gewährleistet eine den in vivo-Bedingungen ähnliche Umgebung für die MSC und stellt eine Alternative zur Kultur auf reiner Plastikoberfläche dar.

Die Frage, ob eine HLA-unabhängige Nutzung, wie von vielen Autoren beschrieben, tatsächlich bedenkenlos möglich ist, konnte nicht geklärt werden. Die Aktivierung von Effektorzellen durch nichtidentische MSC ist ein Ergebnis, das dies stark in Frage stellt. Daher sollte eine HLA-unabhängige Gabe bis zur weiteren Aufklärung der physiologischen Mechanismen der MSC-Interaktion mit dem Immunsystem in vivo nicht favorisiert werden. Besonders im klinischen Setting der akuten GvHD erscheint die Gabe von MSC mit Spenderursprung sinnvoller, da über die möglichen antigenpräsentierenden Fähigkeiten der MSC in einer inflammatorisch geprägten Umgebung auch erwünschte Toleranzmechanismen gegenüber dem Empfängerewebe durch MSC ausgelöst werden könnten.

Schwierigkeiten bereitet es, die gebrauchte Menge an MSC zum Zeitpunkt der Inflammationsreaktion zur Verfügung zu stellen. Für die erfolgreiche Kultur von MSC aus gespendetem Nabelschnurblut, das nur sehr wenige Progenitoren für MSC enthält, wurde errechnet, dass nach der CD3-, CD16-, CD45- und GlyA-Negativselektion und Kultivierung aller CD45/GlyA-negativen Zellen nach der vierten Passage etwa 4×10^6 Zellen zu erwarten sind. Dabei betrug die Zeit bis dahin etwa 5 Wochen. Die beispielsweise für die Einzaldosis eines pädiatrischen Patienten mit einem Gewicht von 30kg vorzuhaltenden Zellmengen von $0,6-1,2 \times 10^8$ Zellen für vier Einzeldosen wurden damit nicht erreicht. Es müssten mit dieser Methode mehr als 15 PRB-Spenden für die Gewinnung der Zellmengen präpariert und gepoolt werden.

Kalkuliert man dies für Knochenmarkaspirate, so gehören maximal 50% der gewonnenen Zellen zur mononukleären Zellfraktion. Die Trennung mit Hilfe der Dichtezentrifugation im geschlossenen System führt zu einem deutlichen Verlust an diesen Zellen. Um 10 Millionen CD45/GlyA-negative Zellen daraus anzureichern, müssen zwischen 5×10^8 bis 10^9 Knochenmarkzellen prozessiert werden.

Aus initial $8,7 \times 10^6$ eingesäten vitalen, CD45/GlyA-negativen Zellen konnten nach etwa 4 Wochen 13×10^8 MSC expandiert werden. Diese Zellmengen sind ausreichend für die Gabe von Mehrfachdosen an pädiatrische sowie auch erwachsene Patienten.

Die dafür benötigten Mengen an Kulturmedium, Seren und Wachstumsfaktoren sind beträchtlich, weil eine geringe Zelldichte während der Kultur eine Voraussetzung für eine gute Expansion ist.

Die Lösung könnte darin bestehen, bei der Aufbereitung der Knochenmarkspenden für die Transplantate von hämatopoetischen Stammzellen gleichzeitig auch die enthaltenen MSC zu kultivieren und expandieren. Diese befinden sich in den Filtersystemen, mit denen größere Knochensplitter aus dem Transplantat entfernt werden. In einem vergleichenden Versuch, in dem Knochenbröckchen und MNC eines Spenders parallel kultiviert wurden, konnten aus weniger als zehn Bröckchen innerhalb von drei Wochen 8×10^6 MSC expandiert werden. Um MSC zu generieren, müsste man so nicht nochmals die Prozedur der Knochenmarkpunktion mit all ihren Risiken durchführen.

Vicente et al. fanden bei ihrer Analyse von Stammzelltransplantationen Hinweise darauf, dass bei Patienten, die gefilterte Transplantate erhielten, häufiger eine akute GvHD sowie eine höhere Mortalität auftraten, als bei Patienten, bei welchen die Filter gespült und die so erhaltenen Zellen rücktransfundiert wurden (Vicente et al. 2006).

Dies deutet darauf hin, dass eine ex vivo Expansion eventuell nicht vonnöten ist, um einen positiven klinischen Effekt zu erzielen. Zur Sicherheit könnte man die verbleibenden Bröckchenreste in eine Kultur nehmen, um eine spätere Gabe gewährleisten zu können. Die Gewinnung der Zellen aus den Filtern und die

Kultivierung sind unter GMP-gerechten Bedingungen möglich. Die Bröckchen lassen sich auch für einen späteren Einsatz kryokonservieren.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

Afzali B, Lombardi G, Lechler RI. Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13(4):438–44.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4):1815–22.

Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T et al. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* 2012; 10(5):544–55.

Anderson P, Carrillo-Gálvez AB, García-Pérez A, Cobo M, Martín F. CD105 (Endoglin)-Negative Murine Mesenchymal Stromal Cells Define a New Multipotent Subpopulation with Distinct Differentiation and Immunomodulatory Capacities. *PLoS ONE* 2013; 8(10):e76979.

Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop Relat Res* 1980; (151):294–307.

Bach F, Hirschhorn K. Lymphocyte interaction: a potential histocompatibility test in vitro. *Science* 1964; 143(3608):813–4.

Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J. Cell. Biochem.* 2003; 89(6):1235–49.

Badillo AT, Beggs KJ, Javazon EH, Tebbets JC, Flake AW. Murine bone marrow stromal progenitor cells elicit an in vivo cellular and humoral alloimmune response. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2007; 13(4):412–22.

Badillo AT, Peranteau WH, Heaton TE, Quinn C, Flake AW. Murine bone marrow derived stromal progenitor cells fail to prevent or treat acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2008; 141(2):224–34.

Bahr L von, Batsis I, Moll G, Hägg M, Szakos A, Sundberg B et al. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells* 2012; 30(7):1575–8.

Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, Lankester A, Cometa A, Egeler RM et al. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2007; 110(7):2764–7.

Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, van Tol, Maarten J. D., Contoli B, Zwaginga JJ et al. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2013 [cited 2013 Nov 25]; 163(4):501–9.

Banfi A, Bianchi G, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Replicative aging and gene expression in long-term cultures of human bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 2002; 8(6):901–10.

Bari C de, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001; 44(8):1928–42.

Barlow S, Brooke G, Chatterjee K, Price G, Pelekanos R, Rossetti T et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2008; 17(6):1095–107.

Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1999; 265(1):134–9.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol* 2002; 30(1):42–8.

Battula VL, Bareiss PM, Trembl S, Conrad S, Albert I, Hojak S et al. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation* 2007; 75(4):279–91.

Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* 2004; 22(5):675–82.

Bayati V, Hashemitabar M, Gazor R, Nejatbakhsh R, Bijannejad D. Expression of surface markers and myogenic potential of rat bone marrow- and adipose-derived stem cells: a comparative study. *Anat Cell Biol* 2013; 46(2):113–21.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114(6):763–76.

Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Pupato E et al. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 2007; 110(9):3438–46.

Bernardo ME, Ball LM, Cometa AM, Roelofs H, Zecca M, Avanzini MA et al. Co-infusion of ex vivo-expanded, parental MSCs prevents life-threatening acute GVHD, but does not reduce the risk of graft failure in pediatric patients undergoing allogeneic umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46(2):200–7.

Bernardo ME, Cometa AM, Locatelli F. Mesenchymal stromal cells: a novel and effective strategy for facilitating engraftment and accelerating hematopoietic recovery after transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2011 [cited 2013 Jun 5]; 47(3):323–9.

Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105(5):2214–9.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19(3):180–92.

Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22(4):625–34.

Bishara A, Brautbar C, Cohen I, Nagler A. Positivity in a modified mixed leukocyte reaction test correlates with molecular HLA-C disparity in prediction of unrelated bone marrow transplantation outcome. *Hum. Immunol.* 1999; 60(9):833–9.

Bocelli-Tyndall C, Bracci L, Spagnoli G, Braccini A, Bouchenaki M, Ceredig R et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and autoimmune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46(3):403–8.

Burr SP, Dazzi F, Garden OA. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? *Immunol Cell Biol* 2012; 91(1):12–8.

Capelli C, Domenghini M, Borleri G, Bellavita P, Poma R, Carobbio A et al. Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40(8):785–91.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991; 9(5):641–50.

Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G et al. The fibronectin isoform containing the ed-b oncofetal domain: A marker of angiogenesis. *Int. J. Cancer* 1994; 59(5):612–8.

Chan WK, Lau AS, Li JC, Law HK, Lau YL, Chan GC. MHC expression kinetics and immunogenicity of mesenchymal stromal cells after short-term IFN- γ challenge. *Experimental Hematology* 2008; 36(11):1545–55.

Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood* 2006; 107(12):4817–24.

Cho PS, Messina DJ, Hirsh EL, Chi N, Goldman SN, Lo DP et al. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood* 2008; 111(1):430–8.

Clark BR, Keating A. Biology of Bone Marrow Stroma. *Ann NY Acad Sci* 1995; 770(1 Bone Marrow T):70–8.

Codarri L, Vallotton L, Ciuffreda D, Venetz J, Garcia M, Hadaya K et al. Expansion and tissue infiltration of an allospecific CD4+CD25+CD45RO+IL-7Ralphahigh cell population in solid organ transplant recipients. *J. Exp. Med* 2007; 204(7):1533–41.

Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97(7):3213–8.

Comoli P, Ginevri F, Maccario R, Avanzini MA, Marconi M, Groff A et al. Human mesenchymal stem cells inhibit antibody production induced in vitro by allostimulation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2008; 23(4):1196–202.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C, Corselli M, Park TS et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3):301–13.

da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* 2006; 119(11):2204–13.

Dånmark S, Finne-Wistrand A, Albertsson A, Patarroyo M, Mustafa K. Integrin-mediated adhesion of human mesenchymal stem cells to extracellular matrix proteins adsorbed to polymer surfaces. *Biomed. Mater.* 2012; 7(3):35011.

Danzer SG, Kirchner H, Rink L. Cytokine interactions in human mixed lymphocyte culture. *Transplantation* 1994; 57(11):1638–42.

Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 2007; 109(10):4119–26.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99(10):3838–43.

D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 14):2971–81.

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J. Bone Miner. Res* 1999; 14(7):1115–22.

Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med* 2007; 11(1):21–38.

Dolley-Sonneville PJ, Romeo LE, Melkounian ZK. Synthetic surface for expansion of human mesenchymal stem cells in xeno-free, chemically defined culture conditions. *PLoS ONE* 2013; 8(8):e70263.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315–7.

Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense J, Begot L, Holy X et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 2005; 205(2):228–36.

Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 2005; 106(13):4057–65.

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126(4):677–89.

English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2012; 91(1):19–26.

English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E 2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4 + CD25 High forkhead box P3 + regulatory T cells. *Clinical & Experimental Immunology* 2009; 156(1):149–60.

English K, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3(5):a015560.

Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol* 2000; 109(1):235–42.

Fang L, Lange C, Engel M, Zander AR, Fehse B. Sensitive balance of suppressing and activating effects of mesenchymal stem cells on T-cell proliferation. *Transplantation* 2006; 82(10):1370–3.

Ferrara, James L M, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373(9674):1550–61.

Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 1999; 5(6):347–56.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279(5356):1528–30.

Flynn A, Barry F, O'Brien T. UC blood-derived mesenchymal stromal cells: an overview. *Cytotherapy* 2007; 9(8):717–26.

Frassoni F, Labopin M, Bacigalupo A, et al. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical hematopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft-versus-host disease: a matched pair analysis. In: *Bone Marrow Transplant* 2002; 29 (suppl 2): .

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3(4):393–403.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4(5):267–74.

Friedenstein A, Piatzky-Shairok I, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology* 1966 [cited 2010 Aug 26]; 3(16):381–90.

Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RCR. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 2007; 109(4):1743–51.

Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp. Hematol.* 2001; 29(3):259–77.

Gonzalo-Daganzo R, Regidor C, Martín-Donaire T, Rico MA, Bautista G, Krsnik I et al. Results of a pilot study on the use of third-party donor mesenchymal stromal cells in cord blood transplantation in adults. *Cytotherapy* 2009; 11(3):278–88.

Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2001; 7(11):581–8.

Götherström C, Ringdén O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le Blanc K. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004; 190(1):239–45.

Griffin MD, Ryan AE, Alagesan S, Lohan P, Treacy O, Ritter T. Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: what have we learned so far? *Immunol. Cell Biol.* 2013; 91(1):40–51.

Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 2002; 81(8):531–5.

Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 1995; 85(4):929–40.

Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* 2001; 28(2):174–81.

Gutierrez-Rodriguez M, Reyes-Maldonado E, Mayani H. Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2000; 18(1):46–52.

Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992; 13(1):69–80.

Horwitz EM, Gordon PL, Koo, Winston K K, Marx JC, Neel MD, McNall RY et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99(13):8932–7.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7(5):393–5.

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat. Med.* 1999; 5(3):309–13.

Hubbell JA. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology* 2003; 14(5):551–8.

Inoue S, Popp FC, Koehl GE, Piso P, Schlitt HJ, Geissler EK et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 2006; 81(11):1589–95.

Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp. Hematol.* 2004; 32(5):414–25.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418(6893):41–9.

Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon S, Jeon HB, Choi SJ et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci* 2013; 14(9):17986–8001.

Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.* 2003; 171(12):6323–7.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5):1294–301.

Kim N, Cho S. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med* 2013 [cited 2013 Dec 4]; 28(4):387.

Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp. Hematol.* 2009; 37(12):1445–53.

Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J. Biomed. Sci.* 2005; 12(1):47–57.

Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J. Clin. Oncol* 2000; 18(2):307–16.

Koç ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp. Hematol.* 1999; 27(11):1675–81.

Kong Q, Sun B, Bai S, Zhai D, Wang G, Liu Y et al. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-beta. *J. Neuroimmunol.* 2009; 207(1-2):83–91.

Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(2):386–98.

Kröger N, Zander AR. *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. 3. Aufl. Bremen: UNI-MED-Verl; 2011.

Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 1997; 97(3):561–70.

Kuznetsov SA, Mankani MH, Robey PG. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation* 2000; 70(12):1780–7.

La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem. Cell Biol.* 2009; 131(2):267–82.

Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 16(4):557–64.

Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol. Blood Marrow Transplant* 2005; 11(5):389–98.

Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371(9624):1579–86.

Le Blanc K, Rasmusson I, Götherström C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M et al. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 2004; 60(3):307–15.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363(9419):1439–41.

Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 2003; 31(10):890–6.

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol* 2003; 57(1):11–20.

Lee SH, Lee MW, Yoo KH, Kim DS, Son MH, Sung KW et al. Co-transplantation of third-party umbilical cord blood-derived MSCs promotes engraftment in children undergoing unrelated umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2013.

Lim SH, Patton WN, Jobson S, Gentle TA, Baynham M, Franklin IM et al. Mixed lymphocyte reactions do not predict severity of graft versus host disease (GVHD) in HLA-DR compatible, sibling bone marrow transplants. *J. Clin. Pathol.* 1988; 41(11):1155–7.

Lucchini G, Introna M, Dander E, Rovelli A, Balduzzi A, Bonanomi S et al. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2010; 16(9):1293–301.

Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005; 90(4):516–25.

MacDermott RP, Bragdon MJ. Fetal calf serum augmentation during cell separation procedures accounts for the majority of human autologous mixed leukocyte reactivity. *Behring Inst. Mitt.* 1983; (72):122–8.

Mackensen A, Drager R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49(3):152–6.

Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004 [cited 2013 Jun 5]; 33(6):597–604.

Majore I, Moretti P, Hass R, Kasper C. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun. Signal* 2009; 7:6.

Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells* 2007; 25(7):1603–9.

Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001; 86(10):1099–100.

Martin PJ, Uberti JP, Soiffer RJ, Klingemann H, Waller EK, Daly AS et al. Prochymal Improves Response Rates In Patients With Steroid-Refractory Acute Graft Versus Host Disease (SR-GVHD) Involving The Liver And Gut: Results Of A Randomized,

Placebo-Controlled, Multicenter Phase III Trial In GVHD. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2010; 16(2):S169.

Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010; 466(7308):829–34.

Mets T, Verdonk G. In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mech Ageing Dev* 1981; 16(1):81–9.

Meuleman N, Tondreau T, Ahmad I, Kwan J, Crockaert F, Delforge A et al. Infusion of mesenchymal stromal cells can aid hematopoietic recovery following allogeneic hematopoietic stem cell myeloablative transplant: a pilot study. *Stem Cells Dev*. 2009; 18(9):1247–52.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100(10):5807–12.

Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 2006; 107(5):1878–87.

Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy* 2006; 8(5):437–44.

Murphy KM, Travers P, Walport M, Janeway CA, Seidler L, Ehrenstein M. *Janeway immunologie*. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl; 2009.

Nasef A, Zhang YZ, Mazurier C, Bouchet S, Bensidhoum M, Francois S et al. Selected Stro-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation. *Int J Lab Hematol* 2009; 31(1):9–19.

Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EGA, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 2006; 108(6):2114–20.

Ning H, Yang F, Jiang M, Hu L, Feng K, Zhang J et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 2008; 22(3):593–9.

Nold P, Brendel C, Neubauer A, Bein G, Hackstein H. Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-based bioreactor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 430(1):325–30.

Olsson R, Remberger M, Schaffer M, Berggren DM, Svahn B, Mattsson J et al. Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2012 [cited 2013 Jun 5]; 48(4):537–43.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410(6829):701–5.

Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 1988; 10:63–76.

Pek YS, Wan ACA, Ying JY. The effect of matrix stiffness on mesenchymal stem cell differentiation in a 3D thixotropic gel. *Biomaterials* 2010; 31(3):385–91.

Peters R, Wolf MJ, van den Broek M, Nuvolone M, Dannenmann S, Stieger B et al. Efficient generation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood in stroma-free liquid culture. *PLoS ONE* 2010; 5(12):e15689.

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284(5417):1168–70.

Phinney DG, Sensebé L. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy* 2013; 15(2):140–5.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143–7.

Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur. J. Immunol.* 2008; 38(6):1745–55.

Possinger K. *Facharzt Hämatologie Onkologie*. 1. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2007.

Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J. Immunol.* 2003; 171(7):3426–34.

Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344(5):385–6.

Rafei M, Birman E, Forner K, Galipeau J. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol. Ther.* 2009; 17(10):1799–803.

Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringdén O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand. J. Immunol* 2007; 65(4):336–43.

Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp. Cell Res.* 2005; 305(1):33–41.

Rasmusson I, Uhlin M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol* 2007; 82(4):887–93.

Reisner Y, Kapoor N, O'Reilly RJ, Good RA. Allogeneic bone marrow transplantation using stem cells fractionated by lectins: VI, in vitro analysis of human and monkey bone marrow cells fractionated by sheep red blood cells and soybean agglutinin. *Lancet* 1980; 2(8208-8209):1320–4.

Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008; 2(2):141–50.

- Rieger K, Marinets O, Fietz T, Körper S, Sommer D, Mücke C et al. Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp. Hematol.* 2005; 33(5):605–11.
- Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006; 81(10):1390–7.
- Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin M, Bouchentouf M, Spaner DE, Galipeau J. Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype. *The Journal of Immunology* 2009; 182(12):7963–73.
- Roszek K, Bomastek K, Drożdżał M, Komoszyński M. Dramatic differences in activity of purines metabolizing ecto-enzymes between mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood and umbilical cord tissue. *Biochem. Cell Biol.* 2013; 91(6):519–25.
- Rowlands AS, George PA, Cooper-White JJ. Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2008; 295(4):C1037-44.
- Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)* 2005; 2:8.
- Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A et al. Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp. Cell Res.* 2003; 287(2):289–300.
- Samuelsson H, Ringdén O, Lönnies H, Le Blanc K. Optimizing in vitro conditions for immunomodulation and expansion of mesenchymal stromal cells. *Cytherapy* 2009; 11(2):129–36.
- Sánchez-Guijo FM, López-Villar O, López-Anglada L, Villarón EM, Muntión S, Díez-Campelo M et al. Allogeneic mesenchymal stem cell therapy for refractory cytopenias after hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion* 2012; 52(5):1086–91.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp. Neurol* 2000; 164(2):247–56.

Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J. Immunol.* 2008; 180(4):2581–7.

Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion* 2007; 47(8):1436–46.

Schmoll H, Höffken K, Possinger K. *Kompandium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie.* 4., völlig überarb. u. erw. Aufl. Berlin: Springer; 2006.

Schrey, Ursula Marietta (geb. Leonhardt). *Abtrennung alloreaktiver Zellen aus Blut zur Verringerung des GvHD-Risikos bei einer Immuntherapie (Donor Lymphozyten Infusion) nach Stammzelltransplantation [Dissertation].* Jena: Friedrich Schiller Universität; 2006.

Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui J, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 2002; 20(6):530–41.

Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* 1997; 89(3):776–9.

Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res. Rev.* 2006; 5(1):91–116.

Shahdadfar A, Frønsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 2005; 23(9):1357–66.

Shih DT, Lee D, Chen S, Tsai R, Huang C, Tsai C et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* 2005; 23(7):1012–20.

Si Y, Zhao Y, Hao H, Fu X, Han W. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Research Reviews* 2011; 10(1):93–103.

Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78(1):55–62.

Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS* 2006; 24(2):462–71.

Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006; 107(4):1484–90.

Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol. Ther.* 2004; 9(5):747–56.

Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood* 2006; 107(6):2570–7.

Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003; 33(6):919–26.

Stewart K, Monk P, Walsh S, Jefferiss CM, Letchford J, Beresford JN. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res.* 2003; 313(3):281–90.

Stewart K, Walsh S, Screen J, Jefferiss CM, Chainey J, Jordan GR et al. Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 1999; 14(8):1345–56.

Sudres M, Norol F, Trenado A, Grégoire S, Charlotte F, Levacher B et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J. Immunol* 2006; 176(12):7761–7.

Teshima T. Th1 and Th17 join forces for acute GVHD. *Blood* 2011; 118(18):4765–7.

Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* 2007; 21(9):1992–9.

Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Delforge A, Massy M, Mortier C et al. Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy* 2004; 6(4):372–9.

Tonti GA, Mannello F. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int. J. Dev. Biol* 2008; 52(8):1023–32.

Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003; 75(3):389–97.

Vicente D, Podestà M, Pitto A, Pozzi S, Lucchetti S, Lamparelli T et al. Progenitor cells trapped in marrow filters can reduce GvHD and transplant mortality. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 38(2):111–7.

Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 116(5):639–48.

Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995; 18(12):1417–26.

Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. PLoS ONE 2010; 5(4):e10088.

Weng JY, Du X, Geng SX, Peng YW, Wang Z, Lu ZS et al. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. Bone Marrow Transplant 2010 [cited 2013 Jun 5]; 45(12):1732–40.

Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. Br. J. Haematol 2003; 121(2):368–74.

Yamaguchi M, Hirayama F, Wakamoto S, Fujihara M, Murahashi H, Sato N et al. Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopoietic stem cells expansion. Transfusion 2002; 42(7):921–7.

Yang S, Ha C, Jung M, Jin H, Lee M, Song H et al. Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. Cytotherapy 2004; 6(5):476–86.

Yen BL, Huang H, Chien C, Jui H, Ko B, Yao M et al. Isolation of multipotent cells from human term placenta. Stem Cells 2005; 23(1):3–9.

Zeddou M, Briquet A, Relic B, Josse C, Malaise MG, Gothot A et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. Cell Biol Int 2010; 34(7):693–701.

Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X et al. Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population. Blood 2009; 113(1):46–57.

Zhou H, Guo M, Bian C, Sun Z, Yang Z, Zeng Y et al. Efficacy of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Sclerodermatous Chronic Graft-versus-Host Disease: Clinical Report. Biology of Blood and Marrow Transplantation 2010; 16(3):403–12.

Zhou HP, Yi DH, Yu SQ, Sun GC, Cui Q, Zhu HL et al. Administration of donor-derived mesenchymal stem cells can prolong the survival of rat cardiac allograft. Transplant Proc 2006; 38(9):3046–51.

Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Experimental and Molecular Pathology* 2006; 80(3):267–74.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7(2):211–28.

Rechtsvorschriften:

Richtlinie 2003/94/EG zur Festlegung der Grundsätze und Leitlinien der Guten Herstellungspraxis für Humanarzneimittel und für zur Anwendung beim Menschen bestimmte Prüfpräparate: Richtlinie 2003/94/EG; 2003.

Verordnung (EG) Nr. 1394/2007 über Arzneimittel und neuartige Therapien und zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG und der Verordnung EG Nr 726/2004: Verordnung (EG) Nr. 1394/2007; 2007.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mittelwerte und Standardabweichungen der gebildeten MSC-Spots pro 10^5 vitaler CD45/GlyA-neg. KM-Zellen in zwei Altersgruppen mit jeweils 7 Spendern

	40
Abbildung 2: MSC aus KM, 4.Passage, Hoffman-Kontrast	48
Abbildung 3: MSC aus PRB, 1.Passage, Hoffman-Kontrast	48
Abbildung 4: MSC aus KM, 4.Passage, CD73 positiv	49
Abbildung 5: MSC aus KM, 4.Passage, CD105 stark positiv	49
Abbildung 6: MSC aus KM, 4.Passage, Stro-1 leicht positiv	49
Abbildung 7: MSC aus KM, 4.Passage, SSEA-4 positiv	49
Abbildung 8: MSC aus PRB, 1.Passage, CD73-negativ	49
Abbildung 9: MSC aus PRB, 1.Passage, CD105 positiv	49
Abbildung 10: MSC aus PRB, 1.Passage, SSEA-4 positiv	50
Abbildung 11: MSC aus PRB, 2.Passage, SSEA-4 negativ	50
Abbildung 12: MSC aus PRB, 1.Passage, Stro-1 leicht positiv	50
Abbildung 13: MSC aus PRB, 2.Passage, Stro-1 negativ	50
Abbildung 14: Anteil CD25-positiver Zellen in den MLR mit MSC in drei Konzentrationen	53
Abbildung 15: Anteil CD25-positiver Zellen in den MLR	54
Abbildung 16: Anteil $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ Zellen in den MLR	55
Abbildung 17: Anteil $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ Zellen in den MLR	55
Abbildung 18: Anzahl IFN- γ produzierender Zellen pro 20000 analysierte Zellen aus den MLR	56
Abbildung 19: Der Einfluss von MSC aus PRB bzw. KM auf die CD25-Expression in der MLR	57
Abbildung 20: Der Einfluss von MSC aus PRB bzw. aus KM auf die IFN- γ produzierenden Zellen von 20000 Zellen am Tag 7	57
Abbildung 21: Anteil CD25-positiver Effektorzellen nach MSC-Kontakt in der MLR	58

Abbildung 22: Anteil $CD4^+CD25^{high}CD127^+$ Effektorzellen nach MSC-Kontakt in der MLR	59
Abbildung 23: Anteil $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ Effektorzellen nach MSC-Kontakt in der MLR	59
Abbildung 24: Der Einfluss von MSC auf die Anzahl der IFN- γ produzierenden Effektorzellen pro 20.000 analysierte Zellen aus der MLR	60
Abbildung 25: Anteil CD25-positiver Zellen in den MLR mit MSC in drei Konzentrationen	61

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausprägung von Oberflächenmarkern auf MSC	12
Tabelle 2: Medien, Puffer und Zusätze	20
Tabelle 3: Antikörper, Beads, Färbesubstanzen	22
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial	24
Tabelle 5: Geräte	24
Tabelle 6: Software	25
Tabelle 7: Zellmaterial	25
Tabelle 8: Beschichtung mit ECM-Komponenten	32
Tabelle 9: Variation der Kulturmedien	32
Tabelle 10: Variation der Seren/FFP	33
Tabelle 11: Variation der Wachstumsfaktoren	33
Tabelle 12: Zugabe von Serumsupplement	33
Tabelle 13: Zeitlicher Ablauf der MLR	34
Tabelle 14: Übersicht Proben der MLR	35
Tabelle 15: Übersicht Proben Durchflusszytometrie	36
Tabelle 16: ELIBead-Assay mit Kontrollen und Proben	37
Tabelle 17: MSC-Separationen aus KM	39
Tabelle 18: Variation der Beschichtung der Kulturgefäße mit ECM-Komponenten	41
Tabelle 19: Variation des Kulturmediums	42
Tabelle 20: Variation der Seren und Serumersatzmittel	43
Tabelle 21: Variation der Wachstumsfaktoren	44
Tabelle 22: Zugabe von synthetischem Serumsupplement	45
Tabelle 23: Fünf verschiedene PRB-Separationen: Morphologie und Expansionsfähigkeit der adhärenen Zellen	46
Tabelle 24: Vergleich von Zellen aus KM und PRB	47
Tabelle 25: Zellzahlen und BrdU-Einbautest am Tag 7	52

9.3 Lebenslauf

<hr/>		Persönliche Angaben
	Name	Sabine Knoll
	Geboren am	14. November 1984
	Geburtsort	Gera
<hr/>		Schulbildung
	1991 bis 1995	17.Grundschule Gera
	1995 bis 2003	Georg-Christoph-Lichtenberg-Gymnasium Gera
	2003	Abitur
<hr/>		Freiwilliges Soziales Jahr
	September bis Oktober 2003 November 2003 bis Juli 2004	IB Jugendwohnheim Gera SRH Waldklinikum Gera, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Allgemeine Innere Medizin
<hr/>		Hochschulstudium
	Oktober 2004 bis Mai 2011 Herbst 2006 Februar 2010 bis Januar 2011	Studium der Humanmedizin an der FSU Jena Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Praktisches Jahr: Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie, Nephrologie und Allgemeine Innere Medizin des SRH Wald-Klinikums Gera Kinderklinik des Universitätsklinikums Jena Klinik für Thorax- und Gefäßchirurgie, Angiologie des SRH Wald-Klinikums Gera Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Approbation als Ärztin
<hr/>		Berufserfahrung
	seit September 2011	Weiterbildung zur Fachärztin für Allgemeinmedizin am SRH Waldklinikum Gera, Klinik für Pneumologie/ Infektologie, Hämatologie/ Onkologie, Diabetologie

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Herr Prof. Dr. med. habil. James F. Beck (Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Abteilung Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie u. Onkologie, Universitätsklinikum Jena)
- Frau Dr. rer. nat. Angelika Müller (Hämatologisch-onkologisches Labor, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Jena)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Gera, den.....

.....

Sabine Knoll

9.5 Danksagung

Ich danke allen, die mich bei der Fertigstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Insbesondere danke ich Prof. Dr. med. habil. James F. Beck für die freundliche Überlassung des Themas.

Großer Dank gebührt Frau Dr. Angelika Müller. Sie hat den langen Prozess dieser Arbeit fachlich und persönlich begleitet und dabei mit konstruktiver Kritik sowie steter Motivation entscheidend zum Gelingen beigetragen.

Frau Carola Wollenhaupt danke ich für die geduldige Einführung in die Methoden und wertvolle Unterstützung bei der Laborarbeit. Ihre immer gute Laune hat mir manch lange Stunde versüßt.

Mein besonderer Dank gebührt schließlich meiner Familie und meinen Freunden, die mir zu Zeit, Mut und Kraft verholfen haben, um dieses Ziel zu erreichen.